

Bleomycin-induzierte interstitielle
Lungengerüsterkrankung:
Beziehung zwischen Bronchoalveolarer
Lavage und histologischen Befunden

Charlotte Schorer

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0113

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung,
Klinikum Großhadern der Universität München

Vorstand: Professor Dr.med.Dr.h.c. Walter Brendel

Bleomycin-induzierte interstitielle Lungengerüsterkrankung:
Beziehung zwischen Bronchoalveolarer Lavage und
histologischen Befunden

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Charlotte Schorer
aus
München
1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. med. Dr. vet.
C. Hammer

Mitberichterstatter: Professor Dr. med. Dr. h.c.
W. Brendel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Privat-Dozent Dr. med.
G. König

Dekan: Professor Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 04. 1988

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	<u>Einleitung und Fragestellung</u>	1
2.	<u>Material und Methode</u>	4
2.1.1	Versuchsgut	4
2.1.2	Behandlung	4
2.2	Methode	4
2.2.1	Durchführung der Bronchoalveolaren Lavage (BAL)	4
2.2.2	Technische Ausrüstung	8
2.3	Medikamente	8
2.3.1	Bleomycin	8
2.3.2	Anästhesie	8
2.3.2.1	Zur BAL	8
2.3.2.2	Zur offenen Lungenbiopsie	10
2.4	Aufarbeitung der Lavageproben	10
2.4.1	Analyse des Zellmaterials	10
2.4.2	Kollagenaseaktivität im zellfreien Überstand der BAL	11
2.5	Aufarbeitung des Blutes	12
2.5.1	Differenzierung der Zellen	12
2.6	Bestimmung arterieller Blutgaswerte	13
2.7	Immunfluoreszenzmikroskopie	13
2.7.1	Technische Ausrüstung	13
2.7.2	Immunfluoreszenz an Lungenzellen	13
2.7.3	Immunfluoreszenz an Zellen aus dem Vollblut	14
2.8	Statistische Auswertung	14
2.9	Biopsien	15
3.	<u>Ergebnisse</u>	16
3.1	Bronchoalveolares Zellbild im Verlauf	16
3.1.1	Kontrollexperimente	16
3.1.2	Einfluß der Bleomycinbehandlung	16
3.2	Verlauf der Kollagenaseaktivität im zellfreien Überstand der Lavage	24
3.2.1	Kontrollversuche	24
3.2.2	Einfluß der Bleomycinbehandlung	24

3.3	Zytologische Befunde im Vollblut nach Bleomycinbehandlung	24
3.4	Arterielle Blutgaswerte	28
3.5	Immunfluoreszenzmessungen	31
3.5.1	Fluoreszenzmarkierte Lungenzellen	31
3.5.2	Fluoreszenzmarkierte Zellen aus dem Vollblut	33
3.6	Histologische Befunde	33
4.	<u>Diskussion</u>	38
4.1	Diskussion der Methode	38
4.1.1	Untersuchungsobjekte	38
4.1.2	Aufarbeitung des Zellmaterials	39
4.1.3	Beeinflussung der arteriellen Blut- gaswerte	39
4.2	Diskussion der Ergebnisse aus der BAL	40
4.2.1	Dynamik der Zusammensetzung der BAL	40
4.2.1.1	Kontrollen	40
4.2.1.2	Einfluß der Bleomycingabe	41
4.2.2	Kollagenaseaktivität in der zellfreien Lavage und Zusammenhang mit der beobach- teten Zelldynamik der BAL	43
4.2.2.1	Kontrolluntersuchungen	43
4.2.2.2	Einfluß der Bleomycinmedikation	44
4.2.3	Zelldynamik im Vollblut und Zusammen- hang mit der Zelldynamik in der BAL während Bleomycinbehandlung	45
4.2.4	Immunologische Bedeutung fluoreszenz- markierter Zellen während Bleomycin- applikation	46
4.2.4.1	In der BAL	46
4.2.4.2	Im Vollblut	47
4.2.5	Lungenhistologie ohne und nach endo- trachealer Bleomycininstillation	48
4.2.6	Vergleich von Zytologie und Histologie	49
5.	<u>Zusammenfassung</u>	51
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	53
Dankesworte		
Lebenslauf		

1. Einleitung und Fragestellung

Die Entwicklung der Bronchoskopie beruht auf einem Versuch Gustav Killians, 1897 mit Hilfe eines starren Ösophagoscops unter Kokainbetäubung einen aspirierten Fremdkörper aus dem rechten Hauptbronchus zu entfernen (79). Vor allem Lemoine und Soulas initiierten die Verbesserung der bronchoscopischen Geräte. Myrvik (55) konnte 1960 im Tierexperiment unter Verwendung eines Fiberglasapparates mit eingebautem Arbeitskanal durch Kochsalzspülung lebendes Zellmaterial aus Kaninchenlungen aspirieren. 1964 schuf dann Ikeda (39) den Prototyp des heutigen flexiblen Fiberbronchoscops. 1974 konnte Huzly (37) in Europa von 400 Untersuchungen mit diesen Geräten berichten. Fast zur gleichen Zeit wurde in Amerika vor allem von Reynolds und Crystal (64) die sogenannte "Bronchoalveolare Lavage" (BAL), die Spülung bestimmter Lungenbereiche mittels eines flexiblen Bronchoscops, in die Klinik eingeführt. Bis heute nahm die Anwendung der flexiblen Bronchoskopie ständig zu. Das Indikationsgebiet erweiterte sich laufend. So kann aufgrund der ausgezeichneten optischen Qualität der Geräte bei Intensivpatienten eine maximale und gezielte Absaugung von Schleimpfröpfen aus peripheren Lungenarealen durchgeführt werden (40, 23). Es ist möglich, unter Sicht einen Endotrachealtubus selbst bei extrem erschwerten Bedingungen richtig einzuführen (48). Die Therapie bronchopulmonaler Erkrankungen wie zum Beispiel Status asthmaticus oder Atelektasen hat durch die flexible Bronchoskopie neue Impulse erhalten (57, 73). Auf pneumologischem Gebiet sind protrahiert ablaufende Pneumonien und unklare Lungenparenchymerkrankungen neben der Karzinomdiagnostik Domänen der flexiblen Bronchoskopie (16, 36).

Das BAL-Zellbild trägt bei interstitiellen Lungenerkrankungen zur differentialdiagnostischen Abgrenzung bei und gibt Auskunft über die Krankheitsaktivität. Daneben sind auch Ergebnisse bekannt, die von prognostischer Bedeutung sind: So wurde zum Beispiel festgestellt, daß bei Patienten mit Idiopathischer Pulmonaler Fibrose (IPF) und erhöhter Zahl von Lymphozyten in der BAL Corticosteroide zum Erfolg führen. Dabei ist ein therapeutischer Erfolg am ehesten zu erwarten, wenn mehr als 11 % Lymphozyten, oder mehr als 5 %

Lymphozyten und gleichzeitig eine erhöhte Anzahl von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten in der BAL vorzufinden sind (70, 51, 56).

Eingesetzt wird diese Untersuchungsmethode außer bei der IPF auch bei der Sarkoidose, der Kollagenose und den exogen induzierten Lungenerkrankungen, wie der Quarzstaub-, Siderose- und Silikoselelung (65, 66, 72, 44).

Allen Lungengerüsterkrankungen scheint ein ähnlicher pathohistologischer Verlauf gemeinsam zu sein (16). So ist aus früheren histologischen Untersuchungen bekannt, daß es zu Beginn der Krankheit in den Wänden der Alveolen zu einer Entzündung, das heißt einer Einwanderung von Lymphozyten und Granulozyten kommt, die als Alveolitis bezeichnet wird. Im weiteren Verlauf ist ein Umbau der Parenchymstrukturen zu beobachten, der zu bindegewebigem Ersatz des eigentlichen Lungenparenchyms durch Kollagen führen kann. Der Krankheitsprozeß endet oftmals in einer irreversiblen Fibrose des Organs.

Ausgelöst wird dieser Prozeß wahrscheinlich durch eine Störung des immunologischen Abwehrsystems der Lunge (8). Es wird vermutet, daß immunologisch aktive Zellen des Lungenparenchyms Mediatorsubstanzen wie Interleukine, chemotaktische Faktoren freisetzen und Fibroblasten aktivieren, denen eine wesentliche Rolle im Ablauf einer Lungengerüsterkrankung zukommt (12).

Die BAL hat auch zu neuen Ansatzpunkten für die Erforschung des "Akuten Respiratorischen Distress Syndroms" (ARDS) geführt (22). So konnten in der BAL von ARDS-Patienten Substanzen nachgewiesen werden, die auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirken (58). Eine andere Untersuchung über die BAL von ARDS-Patienten belegt, daß von neutrophilen Granulozyten produzierte Elastase und die parallel eintretende Kallikrein-Kinin-Kaskade schädigend auf das Lungenparenchym wirken (38). Festgestellt wurde außerdem, daß die Zusammensetzung des Zellverbandes und die physiologischen Zellmechanismen durch Zunahme von T-Zell-Subpopulationen, wie zum Beispiel der Suppressor-Zellen, verändert wird (17).

Eine solche Störung der Zellinteraktionen kann im Experiment durch das Zytostatikum Bleomycin verursacht werden (30, 9, 29).

Die intrabronchiale Applikation von Bleomycin führt über eine Alveolitis zur Lungenfibrose.

Aus klinischen Studien ist bekannt, daß nur die frühe Krankheitsphase, in der histologisch eine Alveolitis vorliegt, einer Therapie zugänglich ist (7). Zur Erfassung des morphologischen Befundes kann die offene Lungenbiopsie eingesetzt werden, die jedoch mit einem höheren Risiko für den Patienten verbunden ist (69). Dagegen kann die "Bronchoalveolare Lavage" ambulant und unter Lokalanästhesie durchgeführt werden (76). Nicht geklärt ist aber bisher, inwieweit die BAL die zellulären Verhältnisse widerspiegelt. Ziel dieser Studie ist daher:

1. Das zeitliche Auftreten bestimmter Zelltypen in der BAL im Vergleich zur Histologie während einer experimentell induzierten, interstitiellen Lungenerkrankung zu erfassen.
2. Den Verlauf bestimmter Zellen in der BAL und im Blut mittels monoklonaler Antikörper während einer Lungengerüsterkrankung zu untersuchen.
3. Schwankungen des Enzyms Kollagenase in der BAL während der Lungenparenchymveränderungen zu messen.
4. Eine Beeinflussung der Blutgase durch die BAL festzustellen.

2. Material und Methode

2.1.1 Versuchsgut

Zur Verfügung standen 10 Mischlingshunde mit einem Gewicht zwischen 10-15 kg. Eine Behandlung erhielten 5 Hunde, 5 weitere dienten als Kontrolle.

2.1.2 Behandlung

Bleomycinsulfat ( Bleomycin Mack Illertissen/Bayern), 2 mg/kg Körpergewicht, gelöst in 10 ml NaCl, wurde endotracheal appliziert. Die Kontrolltiere erhielten nur 10 ml NaCl.

2.2 Methode

2.2.1 Durchführung der Bronchoalveolaren Lavage (BAL)

Nach Anästhesie und Fixation in Rückenlagerung erfolgte die Intubation (2-lumiger Rüschtubus) der Hunde. Zur antibiotischen Prophylaxe wurden während der Bronchoskopie eine Kombination aus 2 Gramm Lamoxactam ( Moxalactam) und 20 mg Tobramycin ( Gernebcin) gegeben. Mit Hilfe eines Elektrokardiogramms konnten Herz- und Kreislauffunktionen überwacht werden. Ein arterieller Zugang in der Arteria femoralis diente der Blutdruckmessung. In üblicher Weise wurde das Bronchoskop über das größere Lumen des zweilumigen Tubus eingeführt, gleichzeitig wurde über das kleinere Lumen unter Spontanatmung Sauerstoff (4-6 Liter/Minute) verabreicht. Durch Entnahme von 2 ml arteriellem Heparinblut war es möglich, die Blutgase zu bestimmen. Die Lavage erfolgte im rechten Mittellappen und im Lingualbronchus (Abb.1). Dazu mußte die Spitze des Bronchoskops weit in der Lungenperipherie in "Wedge-Position" gebracht werden. Über den Arbeitskanal des liegenden Bronchoskops war es möglich, jeden Lungenlappen mit physiologischer Kochsalzlösung, portionsweise jeweils mit 20 ml, bis zu einem Gesamtvolumen von 100 ml, zu spülen. Nach Absaugen der Spülflüssigkeit in sterile Falcon-Röhrchen wurde das Lavagevolumen, jeweils für die rechte und linke Seite getrennt, in einem Meßzylinder bestimmt. Schleimpartikel wurden aus der Flüssigkeit durch Filtration über sterile Gaze entfernt.

TECHNIK DER BRONCHOALVEOLAREN LAVAGE

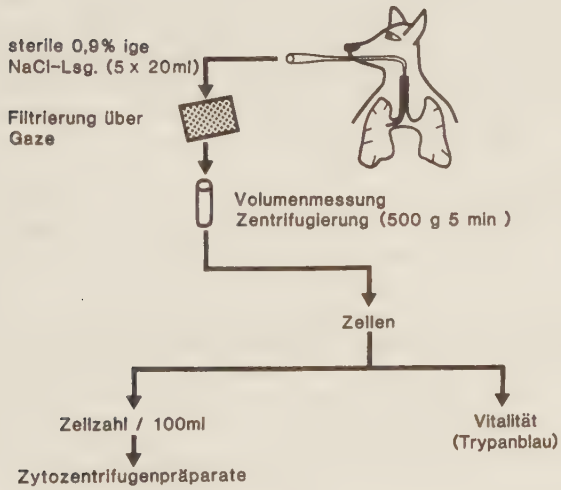


Abb. 1 Schematische Übersicht über die Technik der bronchoalveolaren Lavage und Aufarbeitung des Probenmaterials



Die Lungenspülung erfolgte an allen 10 Hunden einmal wöchentlich (Abb. 2). Die Kontrollen wurden nur lavagiert und erhielten NaCl, während die 5 weiteren Hunde im Anschluß an die Spülung Bleomycin in einer Dosis von 2 mg/kg Körpergewicht intraalveolar instilliert erhielten. Dabei wurden zuerst der rechte Mittellappen und dann die Lingula therapiert. Seitengetrennt wurde die gewonnene Lavage weiter aufgearbeitet. Die Zentrifugation der Flüssigkeit erfolgte bei 500 g für 5 Minuten, wodurch zelluläre und flüssige Bestandteile voneinander separiert werden konnten. Der zellfreie Überstand wurde in Falcon-Röhrchen decantiert und bei -20 Grad Celsius aufbewahrt. In 1 ml Hanks-Lösung (HBSS) resuspendiertes Zellpellet der Lavage war es möglich, weitere Untersuchungen durchzuführen. Parallel dazu erfolgte die Differenzierung von Leukozytensubpopulationen im Vollblut. Zur Gewinnung von biotischem Material für den Vergleich mit der Cytologie aus der BAL wurden die Hunde nach 4 und 8 Wochen thorakotomiert.

In einem Vorversuch zur Klärung der Frage, wie weit Spülflüssigkeit in das Lungenparenchym vordringen konnte, wurde einmalig eine Tuscheinjektion an einem isolierten Herz-Lungen-Präparat durchgeführt. Dazu wurde das flexible Bronchoskop weit in die Peripherie, zuerst der rechten und danach der linken Lunge plziert. War die Spitze in einem Bronchus in "Wedge-Position" gebracht, erfolgte die Injektion von 10 ml eines Tusche-Kochsalzgemisches über den Arbeitskanal des Bronchoskops. Die Verteilung der Tusche in der Lunge wurde mit einer Kamera (Nikon EF) photographiert. Die Schwarzfärbung der Lungenoberfläche zeigte die Tuscheverteilung in den gespülten Arealen an (Abb. 3).

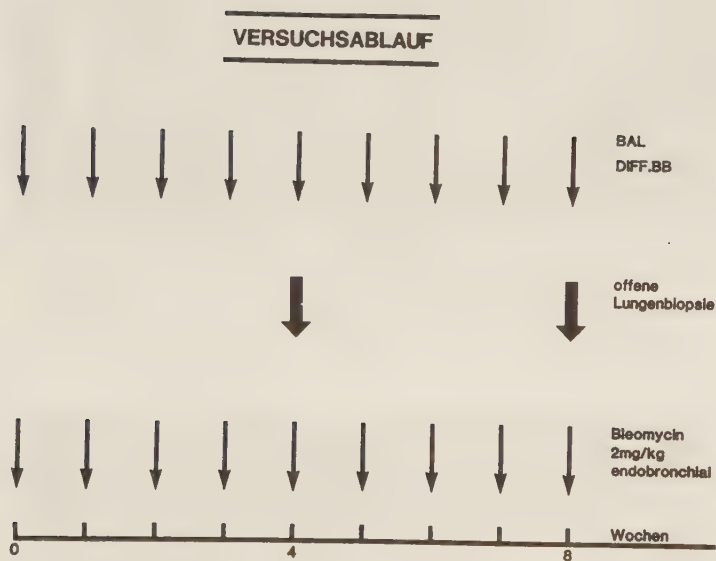


Abb. 2 Zusammenfassung über den Ablauf der verschiedenen experimentellen Untersuchungen

2.2.2 Technische Ausrüstung

Verwendet wurde eine Fiberbronchoskop, Fa. Olympus (BF B3 Olympus) mit einem Außendurchmesser von 5,8 mm und einem Biopsiekanal von 2,0 mm Durchmesser. Über den Instrumentenkanal konnte instilliert und aspiriert werden. Biopsien erfolgten mit Hilfe von kleinen Knipszangen. Zur Lungenspülung über das flexible Bronchoskop wurden ein Sekretsammler und ein zweilumiger Rüschtubus benötigt, die gleichzeitig Bronchoskopie und Insufflation von Sauerstoff (4-6 Liter/Minute) ermöglichen (Abb. 4).

2.3 Medikamente

2.3.1 Bleomycin

Die intrabronchiale Applikation von Bleomycinsulfat (® Bleomycin Mack/Illertissen/Bayern) erfolgte einmal wöchentlich über zwei Monate in einer Dosis von 2 mg/kg Körpergewicht.

2.3.2 Anästhesie

2.3.2.1 Zur BAL

Vor Beginn der BAL wurden 0,4 mg/kg Xylacin (® Rompun 5 % Bayer-Leverkusen) und 10 mg/kg Ketamin (Ketanest 10 % Parke-Davis) intramuskulär verabreicht. Während der 30-minütigen bronchoskopischen Untersuchung wurden 0,5 mg Atropin zur Reduktion der Schleimproduktion und zusätzlich insgesamt 30-50 mg Ketanest 10 %ig über einen intravenösen Zugang injiziert.



Abb. 3 Herz-Lungen-Präparat eines Hundes unmittelbar nach bronchoalveolarer Lavage mit Tusche entnommen. Die dunklen Bezirke in den Lungen kennzeichnen die mit der BAL erreichten Organbezirke

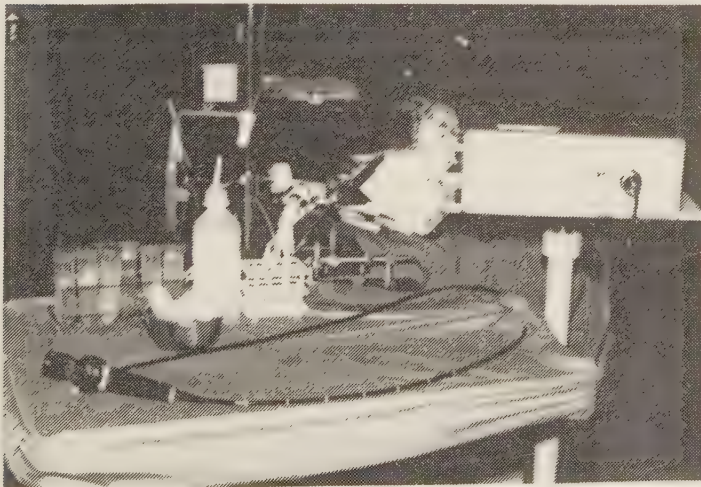


Abb. 4 Verwendetes Fiberbronchoskop der Fa. Olympus; abgesaugte Lavageflüssigkeit in Falcon-Röhrchen und transportable 150 W Lichtquelle

2.3.2.2 Zur offenen Lungenbiopsie

Die Prämedikation bei der offenen Lungenbiopsie bestand aus 5 mg/kg einer 1 %igen Phenothiazin-Lösung ( Combelene) und 2,5 mg/kg Morphin ( Polamivet) gemischt, intramuskulär appliziert.

Die Thorakotomie wurde unter üblicher Kombinationsnarkose, bestehend aus Lachgas/Sauerstoff und dem Narkosegas Enflurane, durchgeführt. Zur Narkosevertiefung dienten zusätzlich insgesamt 20-50 mg Brevimytal-Na ( Methohexital), intravenös verabreicht.

2.4 Aufarbeitung der Lavageproben

2.4.1 Analyse des Zellmaterials

Mit Hilfe eines Zellzählgerätes (Fa. Clay Adams Hematology Analyzer 5) war es möglich, die Zahl der Zellen in der Puffer-Suspension zu bestimmen. Vorhandene Erythrozyten wurden durch Zugabe von 2 ml Bicarbonat-angereicherter Kochsalzlösung hämolysiert. Die Zelldifferenzierung erfolgte anhand von nach Pappenheim gefärbten Zytozentrifugenpräparaten (Fa. Shandon). Nach 6 Minuten Färbung mit May-Grünwald-Lösung wurden die Objektträger kurz mit aqua dest abgespült und 3 Minuten in aqua dest gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte dann über 20 Minuten mit Giemsa-Gebrauchslösung (Giemsa-Stammlösung, 1:33 mit H₂O verdünnt). Anschließend wurde der Ausstrich mit Wasser abgespült und dann schrägstehend an der Luft getrocknet. Daraufhin konnten die Zellen unter 100-facher Vergrößerung mit Ölimmersion nach morphologischen Kriterien differenziert werden. Zur Bestimmung lebender Zellen diente der Trypanblau-Ausschluß-Test, wobei 0,01 ml Zellsuspension mit 0,005 ml 1-%iger Trypanblau-Lösung auf einem Objektträger gemischt wurden. Nach 5 Minuten konnte der prozentuale Anteil der Zellen ausgezählt werden, die fähig waren, ihr Zytoplasma frei von der Farbstofflösung zu halten. Dies waren vitale Zellen.

2.4.2 Kollagenaseaktivität im zellfreien Überstand der BAL

Mit tripelhelikalem 125 J-markierten Kalbskollagen Typ 1,3 und 4 beschichtete man die Innenwand von U-förmigen Behältern (Removawell-System, Fa. Dynateck). Dieses Substrat wurde mit Kollagenase inkubiert und nach einer bestimmten Zeit konnten die Spaltprodukte abgewaschen werden. Daraufhin war die Messung verbliebener Restaktivität in Form von Kollagen möglich, welche dem Reziprokwert der Kollagenaseaktivität entsprach. Die verwendete gelchromatographisch gereinigte Kollagenase stammte aus Zellkulturmedien von Human-Embryo-Fibroblasten.

Durchführung:

a.) Markierung von Kalbskollagen Typ 1,3,4 mit 125 J-Bolton-Hunter-Reagenz:

Von 250 μ Ci (125 J)-Bolton-Hunter-Reagenz konnte das Benzol mit Stickstoff abgeblasen und dann das Reagenz mit 500 μ l Kollagenlösung (1,5 mg Kollagen in 1 ml PO_4 -Puffer) versetzt werden. Die Lösung wurde 5 Stunden im Wasserbad und anschließend 12 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Danach wurde sie mit 2,5 ml 0,5 %iger Essigsäure in einen Dialyseschlauch überspült und gegen 0,5 %ige Essigsäure dialysiert. Die im Gamma-Spektrometer (Beckmann-Gamma 4000) gemessene Aktivität der Lösung betrug 420.000 cpm/10 μ l. Diese wurde mit Puffer auf 150.000 cpm/50 μ l eingestellt.

b.) Beschichtung der U-Becher

Von dem radioaktiv-markierten Kollagen füllte man in jeden Becher 50 μ l ein. Nach 12 Stunden wurde bei Zimmertemperatur mit Puffer gründlich ausgewaschen, um nicht an der Wand haftendes Kollagen zu entfernen. Die verbliebene Restaktivität konnte im Gamma-Spektrometer gemessen werden. Aus ihr ließ sich die restliche Menge Kollagen in ng/Becher errechnen.

c.) Messung der Kollagenaktivität

Je 60 μ l der Lavageflüssigkeit wurden in die vorbereiteten Becher eingefüllt (Doppelbestimmung) und 24 Stunden bei 23°C inkubiert. Diese Inkubationstemperatur war

geeignet, weil sie unterhalb der Denaturierungstemperatur der Kollagenbruchstücke TC^A ($32^{\circ}C$) und TC^B ($29^{\circ}C$) lag.

Durch erneutes Auswaschen des Bechers konnten an der Wand anhaftende Kollagenbruchstücke beseitigt und die Restaktivität bestimmt werden. Diese entsprach nicht gespaltenem, an der Wand des Bechers verbliebenem, markiertem Kollagen. Es war möglich, die durch die Kollagenase von der Becherwand abgelöste Radioaktivität anhand der spezifischen Aktivität des eingesetzten Kollagens in Gewichtsmenge abgebautes Kollagen umzurechnen. Daher wurde im Text der prozentuale Anteil der unter den gewählten Versuchsbedingungen in 24 Stunden abgebauten Kollagenmenge angegeben.

2.5 Aufarbeitung des Blutes

Mittels Dichtezentrifugation wurden 5 ml Blut-Puffer-Lösung über 3 ml Isopaque-Ficoll mit einer Dichte von $1,077 \text{ g/ml}$ geschichtet. Die Ficoll-Isopaque-Floatation und Zentrifugation über 20' bei 270 g trennte die zellulären Elemente des Blutes in zwei Fraktionen (6). Sie bestanden aus:

- a.) Lymphozyten und Monozyten
- b.) Erythrozyten und Granulozyten

Mittels einer Pasteur-Pipette wurde das Plasma-Puffer-Gemisch abgehoben und dann die mononukleären Zellen abgesogen. Für weitere Waschvorgänge erfolgte die Resuspension dieser Zellen in circa dem 3-fachen Volumen des Phosphat-Puffers.

Nach Zentrifugation dieser Zellsuspension über 10 Minuten bei 130 g und Raumtemperatur wurde der Überstand, hauptsächlich aus Thrombozyten und Serumproteinen bestehend, erneut dekantiert. Das Zellpellet wurde resuspendiert und der Waschvorgang noch zweimal wiederholt. Danach erfolgte die Suspension des Zellpellets in 1 ml Hepes-Puffer.

2.5.1 Differenzierung der Zellen

Zellzählung und eine morphologische Differenzierung der Zellen entsprechend 2.4.1 ermöglichten eine Analyse der Zusammensetzung der präparierten Zellsuspension.

2.6 Bestimmung arterieller Blutgaswerte

Zur Bestimmung der Sauerstoff- (PO_2) und Kohlendioxidkonzentration (p CO_2), sowie des pH-Wertes vor und nach der Untersuchung, wurden 2 ml heparinisiertes, arterielles Blut aus der Arteria femoralis verwendet. Die Messung erfolgte mittels eines Blutgasmeßgerätes (ABL 300 Radiometer Copenhagen).

2.7 Immunfluoreszenzmikroskopie

2.7.1 Technische Ausrüstung

Benutzt wurde ein Zeiss Universal Fotomikroskop mit Fluoreszenzausrüstung. Als Erregerlichtquelle diente eine Halogenleuchte 12 V, 100 W. Nach dem Prinzip der Durchlicht-Dunkelfeldererregung konnte eine optimale Ausleuchtung des Präparats erreicht werden. Neben einem Dunkelfeldkondensor wurden ein KP 500 Kurzpassfilter und ein BP 38 Rotfilter zwischengeschaltet. Bei positiver Fluoreszenz war es möglich, im Dunkelfeld des Ölimmersionskondensors einen hellroten Zellkörper mit einem deutlich erkennbaren apfelgrünen Ring zu beobachten. Die negativen Zellen zeigten diesen Ring nicht, wodurch eine exakte Unterscheidung möglich war.

2.7.2 Immunfluoreszenz an Lungenzellen

Ein Tropfen des Lavage-Hanks-Gemisches mit 1×10^6 Zellen wurde jeweils mit einem Tropfen der folgenden Antikörper vermischt:

Maus Anti-Ia: OK Ia₁, OK Ia₂, OK Ia₇₅ (Ortho/Behring)

Diese Substanzen konnten sich mit Antigenen auf der Zelloberfläche von immunologisch aktiven Zellen binden und im ultravioletten Licht durch Emission von Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

Dazu wurde diese Mischung eine Stunde im Kühlschrank bei +4 Grad Celcius aufbewahrt und anschließend mit Hanks-Lösung bei 130 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abheben des Überstandes erfolgte die Zugabe von einem Tropfen Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) -konjugiertem Anti-Maus-Antikörper. Nach mindestens 30 Minuten Inkubationszeit bei + 4⁰ Celsius im Kühlschrank wurden die Zellen

abermals resuspendiert und bei 130 g für 10 Minuten gewaschen. Der Überstand konnte dekantiert werden.

Ein Tropfen des Zellgemisches wurde auf einen geschliffenen Objektträger gegeben, mit einem Deckplättchen vor Austrocknung geschützt und fluoreszenzmikroskopisch bei 1000-facher Vergrößerung mit dem Ölimmersionsobjektiv ausgezählt. Wie unter 2.7.1 erwähnt, zeigten die Zellen mit der jeweiligen antikörperspezifischen Antigenstruktur auf der Zellmembranoberfläche einen apfelgrünen Ring.

2.7.3 Immunfluoreszenz an Zellen aus dem Vollblut

Nach Aufbereitung des venösen Blutes über Ficoll-Dichtezentrifugation (siehe 2.5) wurde 1 Tropfen des mononukleären Konzentrats in entsprechender Weise (siehe 2.7.2) markiert und immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht.

2.8 Statistische Auswertung

Die Tabellen und Abbildungen stellen Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte dar. Zur Prüfung der Signifikanz von Ausgangswerten und Werten unter Bleomycin wurde der t-Test nach Student angewandt.

Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl in 1 ml Lavageflüssigkeit (G_1) erfolgte die Differenzierung nach verschiedenen Zelltypen, wobei 300 Zellen gezählt und der prozentuale Anteil des jeweiligen Zelltyps gemessen wurde. Zur Berechnung der absoluten Anzahl der verschiedenen BA-Zellen diente die Formel 1:

$$1. \quad \frac{G_1 \cdot (10^6) \times \text{Relativprozent des Zelltyps}}{100 \%}$$

Von dem eingesetzten Spülvolumen (100 ml) konnten nur unterschiedliche Anteile wieder aspiriert werden, sodaß die gewonnenen Zellen in einem verschieden großen Gesamtvolumen suspendiert waren. Zur Messung dieses Verdünnungseffekts diente die Formel 2:

$$2. \quad \frac{G_1}{\text{abgesaugte Lavage-Flüssigkeit in ml}}$$

Aus dem Quotient von G_1 und dem gewonnenen Spülvolumen ließ sich die Zahl G_2 bestimmen. Sie entsprach der Gesamtzellzahl pro ml Lavage, die man bei homogener Verteilung der Zellen in der gewonnenen Lavage dann in der Fraktion (1 ml) unter Berücksichtigung der Verdünnung messen konnte.

Zur Berechnung der absoluten Zellzahlen der Subpopulationen wurde unter Einsetzen von G_2 Formel 1 verwendet.

Die Verteilung der Absolutzahlen verschiedener Zellen im Vollblut erfolgte nach Formel 3 aus dem Produkt der Leukozytenzahl im Blut mit der ermittelten Prozentzahl des Zelltyps dividiert durch 100 %:

$$3. \quad \frac{\text{Leukozytenzahl} \times \text{Relativprozent des Zelltyps}}{100 \%}$$

2.9 Biopsien

Unter Intubationsnarkose wurde nach jeder 4. bronchoalveolaren Lavage eine Thorakotomie durchgeführt und Lungengewebe aus dem rechten Mittellappen und der Lingula entnommen. Dazu ging man in Höhe des 4. und 5. Zwischenrippenraumes ein und resezierte mit einem Skalpell ein circa 2 x 2 cm großes Parenchymstück. Eine chirurgische Versorgung des Wundareals erfolgte mit zwei Situationsnähten. Die Bülau-Drainage wurde unmittelbar nach Verschluß des Thorax gezogen. Ein Korkbrettchen diente zum Zerschneiden des gewonnenen Lungenparenchyms in 0,5 cm dicke, rechteckige Stücke, die anschließend in 10 %igem Formalin fixiert wurden. Aus den post mortem erhaltenen Herz-Lungen-Präparaten entnahmen wir Gewebeproben vom rechten Mittellappen und der Lingula. In der gleichen Weise wurde das Lungengewebe konserviert, in Paraffin gegossen, Dünnschnitte hergestellt und diese nach Pappenheim und van Gieson gefärbt.

3. Ergebnisse

3.1 Bronchoalveolares Zellbild im Verlauf

3.1.1 Kontrollexperimente

Die Gesamtzellzahl der in der BAL vorkommenden Zellen blieb während des 8-wöchigen Untersuchungszeitraumes auf gleichem Niveau (Tab.1). Der Anteil der zurückgewonnenen Lavageflüssigkeit (content 100 ml) von im Mittel $48,4 \pm 3,8$ ml änderte sich unwesentlich (Tab.1).

Prozentwerte der Zelltypen:

Alveolarmakrophagen, Lymphozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten blieben bei konstanten Werten. 90 ± 5 % der Zellen waren vital (Abb.5). Das bronchoalveolare Zellbild der Kontrolltiere war vor allem von Alveolarmakrophagen geprägt (Abb.6).

Absolutzahlen der Zelltypen:

Die Absolutzahlen wiesen keine signifikanten Veränderungen in den einzelnen Subpopulationen auf, auch nicht nach Berücksichtigung des Verdünnungseffekts (Tab.1). Dazu wurde die Menge verwendeter Spülflüssigkeit im Verhältnis zur wiedergewonnenen Menge auf die jeweilige Zahl von Zellen pro abgesaugtem Lavagevolumen umgerechnet. Eine gravierende Zu- oder Abnahme eines Zelltyps konnte auch hier nicht festgestellt werden (Tab.2).

3.1.2 Einfluß der Bleomycinbehandlung

Durch die endobronchiale Bleomycinapplikation konnten deutliche Veränderungen der zellulären Bestandteile in der BAL induziert werden.

So stieg die Gesamtzahl der Zellen während der ersten 3 Wochen signifikant ($p < 0,05$) an, fiel bis zur 4. Woche statistisch gesichert ($p < 0,05$) ab und blieb bis zum Versuchsende auf niedrigem Niveau (Tab.3). Das Volumen der Lavage betrug während der 8-wöchigen Beobachtungszeit im Mittel $42,6 \pm 7,4$ ml (Tab.3).

Prozentwerte der Zelltypen:

Der Wert der Alveolarmakrophagen sank während der 1. Woche deutlich ($p < 0,05$) ab und blieb niedrig (Abb.7). Der Anteil der Lymphozyten nahm während der 1. Woche zu ($p < 0,005$) und zeigte im weiteren Verlauf keine Veränderung (Abb.7).

Tabelle 1 Bronchoalveolare Lavage des Normalkollektivs

Woche		0.	1.	2.	3.	4.	5.
Volumen	m	49	52	54	45	45	45
	ml sd	± 5	± 7	± 10	± 3	± 2	± 2
Gesamt- zellzahl 10^5	m	58	53	68	61	62	79
	sd	± 34	± 25	± 68	± 10	± 15	± 79
AM x 10^5	m	57	48	30	55	43	74
	sd	± 12	± 25	± 28	± 11	± 24	± 9
LY x 10^5	m	6	3	3	4	2	3
	sd	± 5	± 1	± 8	± 1	$\pm 0,4$	± 1
SEG x 10^5	m	3	1	4	3	2	2
	sd	± 2	± 1	± 2	$\pm 0,7$	$\pm 0,7$	$\pm 0,7$
EOS x 10^5	m	3	3	4	1	1	0
	sd	± 2	± 3	± 4	$\pm 0,7$	± 1	± 0

Leg.: Volumen der abgesaugten Lavage von 5 Hunden.

Angegeben in wöchentlichen Abständen in ml $\pm$ SD.

Absolute Zahlen in $1 \times 10^5 \pm$ SD von Gesamt-BAL-Zellen, Alveolarmakrophagen (AM), Lymphozyten (LY), segmentkernige Granulozyten (SEG) und eosinophile Granulozyten (EOS).

BRONCHO-ALVEOLARE-LAVAGE

NORMALLAVAGE:

n = 10

Spüfflüssigkeit 100 ml
abgesaugtes Volumen 49 ± 5 ml
Gesamtzellzahl $11 \pm 2 \times 10^6$
vitale Zellen 90 ± 5 %

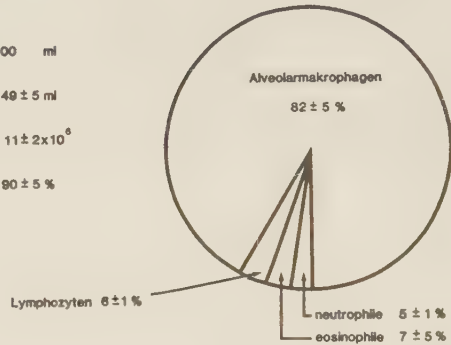


Abb. 5 Normallavage von 10 Hunden. Angegeben zum Versuchsbeginn

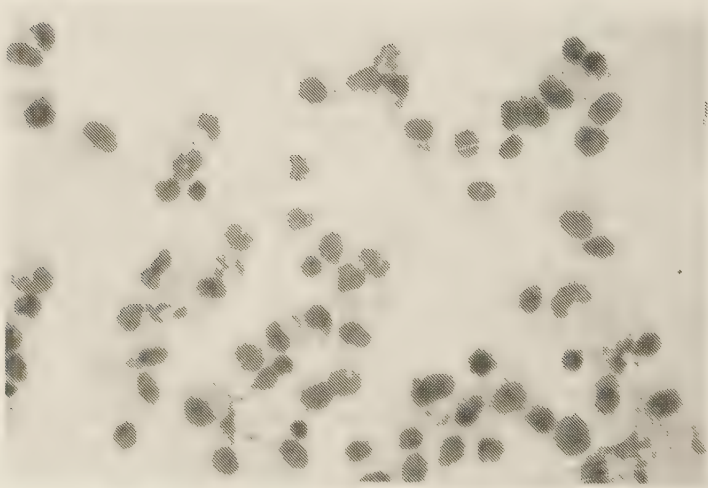


Abb. 6 Normales bronchoalveolares Zellbild mit überwiegender Alveolarmakrophagen, wenig Lymphozyten und vereinzelt neutrophilen Granulozyten

Tabelle 2 Bronchoalveolare Lavage des Normalkollektivs

Woche		0.	1.	2.	3.	4.	5.
Gesamt- zellzahl 10^5	m	151	107	130	137	141	176
	sd	± 59	± 40	± 47	± 21	± 35	± 11
AM x 10^5	m	130	82	112	123	129	164
	sd	± 60	± 21	± 49	± 22	± 38	± 11
LY x 10^5	m	11	21	6	7	5	6
	sd	± 6	± 19	± 2	± 2	± 2	± 2
SEG x 10^5	m	5	2	4	7	5	4
	sd	± 4	± 2	± 2	± 2	± 2	$\pm 0,3$
EOS x 10^5	m	5	6	8	2	2	0
	sd	± 5	± 6	± 9	± 2	± 3	± 0

Leg.: Werte unter Berechnung der jeweiligen Gesamtzellzahl pro ml Lavage umgerechnet auf das wiedergewonnene Spülvolumen. Absolute Zahlen von Gesamt-BAL-Zellen, Alveolarmakrophagen (AM), Lymphozyten (LY), segmentkernige Granulozyten (SEG) und eosinophile Granulozyten (EOS) von 5 Hunden. Angegeben in wöchentlichen Abständen in $1 \times 10^5 \pm$ SD.

Tabelle 3 Ergebnisse der Bronchoalveolaren Lavage nach Bleomycinbehandlung

Woche		0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Volumen	m	48	49	54	45	35	35	43	45	31
ml	sd	$\pm 8,2$	± 9	± 10	± 5	± 11	± 17	± 23	± 4	± 5
Gesamt- zellzahl	m	60	73	99	xx 106	xx 46	20	32	38	28
10^5	sd	± 45	± 32	± 80	± 36	± 24	± 14	± 18	± 19	± 17
AM x 10^5	m	54	50	60	54	xx 29	9	17	17	10
	sd	± 38	± 28	± 5	± 22	± 18	± 8	± 13	± 2	± 7
LY x 10^5	m	3	xx 14	xx 21	xx 20	xx 7	3	5	8	8
	sd	± 3	± 9	± 18	± 20	± 2	± 2	± 1	± 5	± 9
SEG x 10^5	m	3	4	xx 9	xx 26	xx 8	6	12	8	9
	sd	± 4	± 5	± 8	± 12	± 5	± 7	± 3	± 2	± 7
EOS x 10^5	m	0,3	4	11	4	1	0,3	0,2	0,6	0,3
	sd	$\pm 0,4$	± 3	± 13	± 2	$\pm 0,9$	$\pm 0,2$	$\pm 0,2$	$\pm 0,3$	$\pm 0,3$

Leg.: Volumen der abgesaugten Lavage von 5 Hunden.

Angegeben in wöchentlichen Abständen in ml $\pm$ SD.

Absolute Zahlen in $1 \times 10^5 \pm$ SD von Gesamt-BAL-Zellen, Alveolarmakrophagen (AM), Lymphozyten (LY), segmentkernigen Granulozyten (SEG) und eosinophilen Granulozyten (EOS).

x $p < 0,01$

xx $p < 0,05$

xxx $p < 0,001$

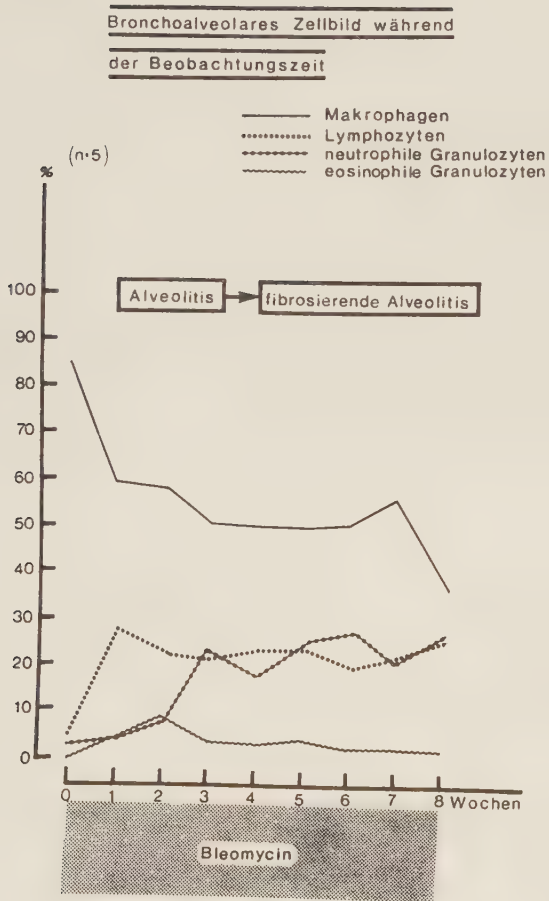


Abb. 7 Prozentualer Anteil bronchoalveolarer Zellen im Verlauf einer bleomycin-induzierten Lungen-
gerüsterkrankung

Im Zellbild einer Lavage nach der 1. Woche traten vermehrt Lymphozyten auf (Abb.8). Die Prozentzahl der neutrophilen Granulozyten stieg erst in der 2. Woche signifikant ($p < 0,05$) an und blieb bis zum Beobachtungsende erhöht (Abb.7).

Das Zellbild der BAL wies während der 3. Woche vor allem neutrophile Granulozyten auf (Abb.9). Auch prozentual stiegen eosinophile Granulozyten in der 1. Woche statistisch signifikant ($p < 0,05$) an. Bis zum Versuchsende sanken diese aber wieder auf den Ausgangspunkt ab.

Absolutzahlen der Zelltypen:

Die Anzahl der Alveolarmakrophagen nahm während der 4. Woche wesentlich ($p < 0,05$) ab und blieb auf niedrigem Niveau (Tab.3).

Eine starke ($p < 0,05$) Zunahme der Zahl der Lymphozyten war in der 1. Woche festzustellen. Sie fiel dann während der 4. Woche bis zum Therapieende deutlich ($p < 0,05$) ab (Tab.3).

Während der 2. und 3. Woche stiegen die neutrophilen Granulozyten signifikant ($p < 0,05$) an. Bis zur 4. Woche folgte eine gesicherte ($p < 0,05$) Verminderung. Bis zum Behandlungsende blieb eine leichte Erhöhung bestehen (Tab.3).

Der Verlauf der eosinophilen Granulozyten wies keine gravierenden Veränderungen auf (Tab.3).

Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, wurde auch für die bleomycinbehandelten Versuchstiere der Verdünnungseffekt durch das aspirierte Lavagevolumen berechnet. Die Menge der wiedergewonnenen Spülflüssigkeit hatte keinen zusätzlichen Einfluß auf die quantitativen Veränderungen der einzelnen Zelltypen nach Bleomycinbehandlung (Tab.4).

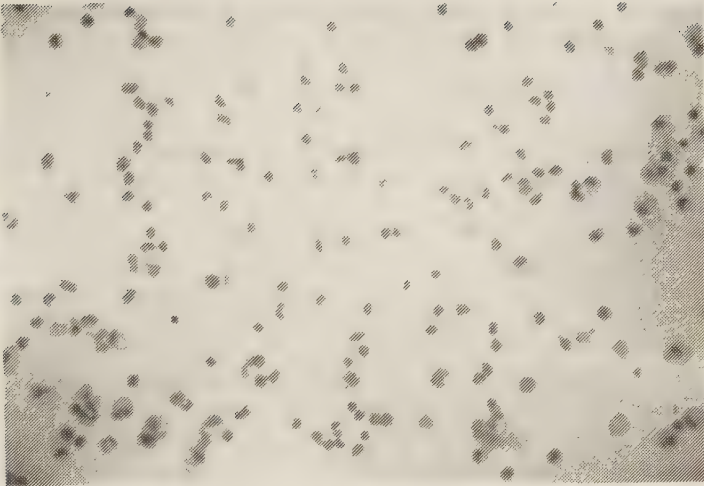


Abb. 8 Bronchoalveolares Zellbild mit zahlreichen Lymphozyten bei florider Alveolitis nach der 1. Woche Bleomycinbehandlung vom Hund

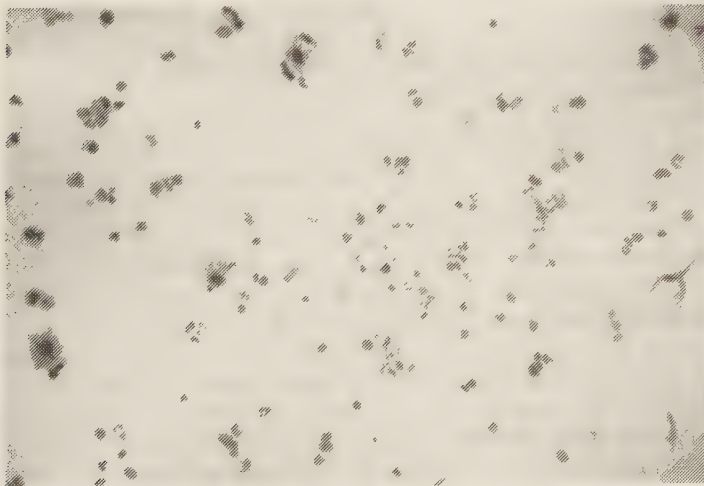


Abb. 9 Bronchoalveolares Zellbild mit zahlreichen neutrophilen Granulozyten bei fibrosierender Alveolitis nach der 2. Woche Bleomycinbehandlung vom Hund

3.2 Verlauf der Kollagenaseaktivität im zellfreien Überstand der Lavage

3.2.1 Kontrollversuche

Die Messung der Kollagenaseaktivität wurde für die 3 Kollagentypen 1, 3 und 4 im zellfreien Überstand der BAL durchgeführt.

Die Abbauraten der 3 Enzymtypen wiesen keine großen Unterschiede auf (Tab.5).

3.2.2 Einfluß der Bleomycinbehandlung

In der Versuchsgruppe nahm die Kollagenaseaktivität für Kollagen-Typ 1 und 3 während der 1. und 2. Woche gravierend ($p < 0,01$) ab und stieg während der 3. Woche stark ($p < 0,05$) an. Bis zum Ende des 8-wöchigen Untersuchungszeitraumes wurden keine wesentlichen Schwankungen beobachtet. Für Kollagentyp 4 wurden bis zur 4. Woche nur leichte quantitative Veränderungen festgestellt. Jedoch konnte während der 5. Woche eine gesicherte ($p < 0,05$) Abnahme gemessen werden. Bis zum Versuchsende blieb die Prozentrage auf dieser Höhe (Tab.5).

3.3 Zytologische Befunde im Vollblut nach Bleomycinbehandlung

Die intrabronchiale Applikation von Bleomycin führte auch zu Unterschieden in der Zellzusammensetzung des Blutes. Die Zahl der Leukozyten wies während der ersten 4 Wochen keine gravierenden Schwankungen auf. Danach stieg sie gegenüber dem Ausgangspunkt stark ($p < 0,05$) an (Tab.6).

Prozentwerte der Zelltypen:

Der relative Anteil der Lymphozyten nahm bis zur 2. Woche signifikant ($p < 0,05$) zu und fiel dann auf das Ausgangsniveau zurück. Im weiteren Verlauf konnten keine wesentlichen Veränderungen mehr gemessen werden.

Erwartungsgemäß war der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten im Vergleich zum Ausgangspunkt bis zur 2. Woche ($p < 0,05$) niedriger. Auch während der 4. Woche zeigte sich eine statistisch gesicherte ($p < 0,05$) Abnahme.

Tabelle 4 Brochoalveolare Lavage nach Bleomycinbehandlung

Woche		0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Gesamt- zellzahl 10^5	m sd	144 ± 38	153 ± 39	172 ± 41	XX 242 ± 49	XX 130 ± 36	54 ± 23	72 ± 27	90 ± 30	96 ± 31
AM $\times 10^5$	m sd	128 ± 36	107 ± 33	101 ± 32	127 ± 36	XX 76 ± 28	26 ± 16	35 ± 19	47 ± 22	33 ± 18
LY $\times 10^5$	m sd	7 ± 8	XX 28 ± 17	XX 37 ± 19	XX 46 ± 21	XX 24 ± 15	10 ± 10	13 ± 11	19 ± 14	28 ± 17
SEG $\times 10^5$	m sd	7 ± 8	7 ± 8	XX 15 ± 12	XX 53 ± 23	XX 23 ± 15	15 ± 12	18 ± 13	28 ± 17	31 ± 18
EOS $\times 10^5$	m sd	0,6 ± 2	7 ± 8	15 ± 12	13 ± 11	3 ± 6	1 ± 3	0,8 ± 3	1 ± 3	1 ± 3

Leg.: Werte unter Berechnung der jeweiligen Gesamtzellen-
zahl pro ml Lavage umgerechnet auf das wiedergewon-
nene Spülvolumen. Absolute Zahlen von Gesamt-BAL-
Zellen, Alveolamakrophagen (AM), Lymphozyten (LY),
segmentkernigen Granulozyten (SEG) und eosinophilen
Granulozyten (EOS) von 5 Hunden. Angegeben in wö-
chentlichen Abständen in $1 \times 10^5 \pm$ SD.

x $p < 0,01$

xx $p < 0,05$

xxx $p < 0,001$

Tabelle 5 Abbauraten der Kollagentypen

Woche	0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Typ 1 % Kontrollen m sd	19,1 ±6,6	21,2 ±5,4	19,2 ±2,9	20,7 ±4,8	22,0 ±4,4				
Bleomycin- m behandelte sd	18,0 ±8,2	x 13,8 ±5,2	x 13,6 ±6,2	xx 17,6 ±7,0	17,2 ±8,0	15,6 ±5,8	17,3 ±2,6	18,5 ±4,8	18,3 ±5,7
Typ 3 % Kontrollen m sd	25,8 ±3,9	30,4 ±3,0	26,5 ±7,4	29,7 ±3,6	26,7 ±0,3				
Bleomycin- m behandelte sd	18,9 ±5,8	x 17,5 ±3,5	x 16,4 ±7,4	xx 22,2 ±10,2	19,1 ±5,1	17,1 ±6,6	16,9 ±5,1	17,5 ±6,8	15,8 ±0,9
Typ 4 % Kontrollen m sd	7,5 ±2,0	8,5 ±3,1	7,9 ±0,7	8,2 ±3,0	9,0 ±6,2				
Bleomycin- m behandelte sd	8,1 ±2,2	8,4 ±5,1	8,2 ±1,9	9,4 ±2,1	9,6 ±1,3	xx 6,8 ±1,1	7,7 ±0,8	6,6 ±0,7	7,1 ±0,9

Leg.: Unterschiede in den Abbauraten der Kollagentypen 1, 3 und 4, die im Lavageüberstand von 5 Kontrolltieren und von 5 Bleomycinbehandelten Tieren gefunden wurden. Angegeben in Prozent im Verlauf von 4 Wochen bei den Kontrolltieren und während 8 Wochen bei den bleomycinbehandelten Tieren.

x $p < 0,01$

xx $p < 0,05$

xxx $p < 0,001$

Tabelle 6 Differential-Blutbild nach Bleomycinbehandlung

Woche		0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
LEUKOS 10^3	m	7,0	6,5	9,6	10,5	6,8	xx	11,3	13,8	9,8
	sd	$\pm 3,0$	$\pm 1,9$	$\pm 2,7$	$\pm 4,2$	$\pm 2,1$	$\pm 7,4$	$\pm 1,8$	$\pm 6,6$	$\pm 1,8$
LY $\times 10^3$	m	1,1	0,6	1,8	xx	0,8	1,1	1,0	—	1,4
	sd	$\pm 0,7$	$\pm 2,8$	$\pm 0,8$	$\pm 0,2$	$\pm 0,4$	$\pm 1,0$	$\pm 0,9$	—	$\pm 1,6$
SEG $\times 10^3$	m	6,3	5,3	7,3	8,9	4,8	xx	9,8	—	8,0
	sd	$\pm 2,5$	$\pm 1,3$	$\pm 2,5$	$\pm 3,7$	$\pm 1,8$	$\pm 2,8$	$\pm 0,8$	—	$\pm 0,7$
EOS $\times 10^3$	m	0,3	0,7	0,2	0,3	0,7	—	0,4	—	0,4
	sd	$\pm 0,2$	$\pm 0,3$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,4$	—	$\pm 0,3$	—	$\pm 0,3$

Leg.: Gesamtzahl der Leukozyten (LEUKOS), Subtypen wie Lymphozyten (LY), segmentkernige Granulozyten (SEG) und eosinophile Granulozyten (EOS) von 5 Hunden. Angegeben in 1×10^3 pro $\text{mm}^3 \pm \text{SD}$ im Verlauf von 8 Wochen.

x $p < 0,01$

xx $p < 0,05$

xxx $p < 0,001$

Danach erfuhr dieser Zelltyp eine gravierende ($p < 0,05$) Steigerung, auf der er bis Therapieende blieb.

Die eosinophilen Granulozyten nahmen bis zur 1. Woche wesentlich ($p < 0,05$) zu, folgend sanken sie wieder ($p < 0,01$) ab und blieben auf diesem Niveau (Tab.7).

Absolutzahlen der Zelltypen:

Deutlich ($p < 0,05$) stieg die Zahl der Lymphozyten bis zur 2. Woche an, fiel dann stark ($p < 0,05$) ab und zeigte keine gravierenden Veränderungen mehr.

Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten erfuhr während der ersten 3 Wochen keine großen quantitativen Veränderungen. Jedoch sank sie während der 4. Woche signifikant ($p < 0,05$), um in der 6. Woche wiederum ($p < 0,05$) zuzunehmen. Dieser Wert wurde bis zum Beobachtungsende in etwa eingehalten. Einschneidende Veränderungen der eosinophilen Granulozyten waren nicht zu beobachten (Tab.6).

3.4 Arterielle Blutgaswerte

Durch die Bleomycintherapie wurden, abgesehen von einer signifikanten ($p < 0,05$) Erhöhung des CO_2 -Wertes in der 3. Behandlungswoche vor Durchführung der BAL, keine weiteren Veränderungen der Blutgaswerte bei Raumluft verursacht. Die Daten aus der Tabelle 8 zeigen nicht nur den Sauerstoff und Kohlendioxidpartialdruck während der Bleomycintherapie, sondern auch direkt nach Durchführung der BAL.

Im Mittel betrug der Sauerstoffpartialdruck vor der Lavage $81,4 \pm$ mm Hg und während der Untersuchung, bei Sauerstoffinsufflation, $138,5 \pm 9,6$ mm Hg. Der Kohlenstoffdioxidpartialdruck war vor der Durchführung der Lungenspülung im Mittel, gemessen an 5 Hunden, 42 mm Hg $\pm 2,8$. Er stieg nach der Untersuchung nur unwesentlich an.

Der pH-Wert blieb während 5 Wochen sowie vor und nach der Lavage konstant auf $7,39 \pm 0,04$.

Tabelle 7 Differential-Blutbild nach Bleomycinbehandlung

Woche		0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
LY $\times 10^3$	m			XX						
	sd	12,2 $\pm 6,6$	8,0 ± 5	19,2 ± 7	10,0 $\pm 5,9$	12,2 $\pm 2,6$	6,7 ± 4	8,7 $\pm 6,7$	— —	9,6 $\pm 7,3$
SEG $\times 10^3$	m			XX		XX	XX			
	sd	85,5 $\pm 3,7$	83,5 $\pm 8,2$	75,8 ± 10	84,4 $\pm 4,8$	72,6 ± 21	93,0 $\pm 4,6$	88,0 $\pm 7,2$	— —	83 ± 14
EOS $\times 10^3$	m		XX	X						
	sd	2,2 $\pm 1,9$	8,4 $\pm 4,3$	4,0 $\pm 3,9$	4,4 $\pm 3,4$	0,3 $\pm 4,5$	0,3 $\pm 0,6$	3,3 $\pm 3,2$	— —	4 $\pm 2,6$

Leg.: Prozentualer Anteil von Lymphozyten (LY),
segmentkernigen Granulozyten (SEG) und eosinophilen
Granulozyten (EOS) von 5 Hunden. Angegeben in Prozent
 $\pm$ SD im Verlauf von 8 Wochen.

x $p < 0,01$
xx $p < 0,05$
xxx $p < 0,001$

Tabelle 8 Blutgase bleomycinbehandelter Versuchstiere

Woche		0.	1.	2.	3.	4.
pO ₂ (mm Hg)						
vor BAL	m	81,3	87,0	80,0	77,0	85,3
	sd	±8,3	±4,4	±8,3	±12,0	±3,4
nach BAL	m	133,0	146,0	153,3	127,8	152,0
	sd	±45,0	±50,8	±26,5	±13,6	±10,6
pCO ₂ (mm Hg)						
vor BAL	m	37,8	40,2	42,3	XX	42,2
	sd	±5,0	±0,6	±0,8	±4,7	±1,6
nach BAL	m	44,5	50,0	45,8	47,0	50,0
	sd	±4,3	±12,5	±3,8	±4,1	±8,5
pH						
vor BAL	m	7,38	7,40	7,36	7,40	7,36
	sd	±0,02	±0	±0,06	±0	±0,03
nach BAL	m	7,45	7,45	7,45	7,40	7,40
	sd	±0,09	±0,05	±0,05	±0	±0

Leg.: Veränderungen von pO₂, pCO₂ und pH im arteriellen Blut von Bleomycinbehandelten Versuchstieren.
 Angegeben in mm Hg und units im Verlauf von 4 Wochen.

x p < 0,01
 xx p < 0,05
 xxx p < 0,001

3.5 Immunfluoreszenz-Messungen

3.5.1 Fluoreszenzmarkierte Lungenzellen

Die Zahl der mit Ia_1 , $-Ia_2$, $-Ia_{75}$ - Antikörpern-markierten Lungenzellen verlief voneinander abweichend. Zusätzlich konnten für die beiden in der Lavage feststellbaren Zellgruppen, die Alveolarmakrophagen und polymorphnukleären Zellen (PMN-Zellen), unterschiedliche Werte gemessen werden.

Die Zahl der Ia_1 -positiven Alveolarmakrophagen erfuhr bis zur 1. Woche eine signifikante ($p < 0,05$) Abnahme. Bis zur 4. Woche stieg sie dann ebenso ($p < 0,05$) wieder an (Abb.10).

Im Verlauf der Ia_2 -markierten Makrophagen konnte erst bis zur 3. Woche eine statistisch gesicherte ($p < 0,01$) Erhöhung festgestellt werden. Auch während der 4. Woche bleiben sie auf diesem Niveau (Abb.10).

Im Gegensatz zu den Ia_1 - und Ia_2 -positiven Alveolarmakrophagen war bei den Ia_{75} -positiven eine prozentuale Abnahme ($p < 0,05$) schon ab der 1. Woche und während der folgenden Zeit bis zur 4. Woche zu beobachten (Abb.11).

Die polymorphnukleären Ia_1 - und Ia_2 -positiven Zellen zeigten erst bis zur 4. Woche eine gesicherte ($p < 0,05$) Zunahme (Abb.11).

Die Ia_{75} -markierten Zellen erfuhren schon während der ersten 3 Wochen eine signifikante ($p < 0,05$) Steigerung, der eine gleiche ($p < 0,05$) Verminderung bis zur 4. Woche folgte (Abb.11).

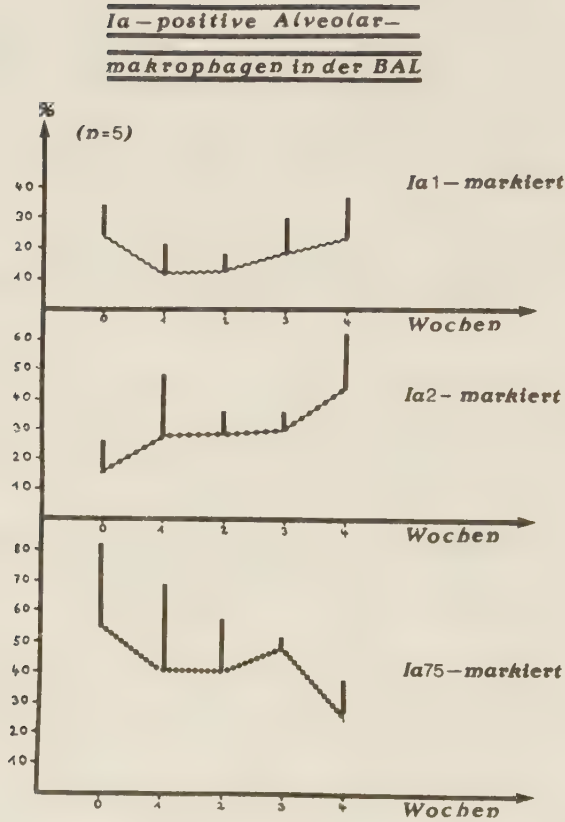


Abb. 10 Unterschiede der Fluoreszenzmarkierung von Alveolarmakrophagen während 4-wöchiger Bleomycintherapie

3.5.2 Fluoreszenzmarkierte Zellen aus dem Vollblut

Werte Ia₁-markierter PMN-Zellen schwankten während der ersten 3 Wochen nur ganz unwesentlich. Ia₂-positive PMN-Zellen nahmen während der ersten 3 Wochen stark ($p < 0,005$) zu. In der 4. Woche war eine sinkende Tendenz zu beobachten. Ia₇₅-markierte Zellen wiesen nach gleichbleibenden Werten schließlich in der 4. Woche eine statistisch gesicherte ($p < 0,05$) Verminderung auf (Abb.12).

3.6 Histologische Befunde

Im Gegensatz zu gesunden Hunden entwickelten sich nach 4 Wochen Bleomycingabe in den so behandelten Hunden pathologische Veränderungen im Sinne einer Alveolitis (Abb.13,14).

Unter Einwanderung von Lymphozyten und Granulozyten verbreitete sich das Interstitium. Vereinzelt konnten Thrombozytenaggregate in kleinlumigen Blutgefäßen festgestellt werden.

Weder das Bindegewebe vermehrte sich, noch kam es zu einem sekundären Organumbau im Sinne einer Fibrose. Nach weiteren 4 Wochen trat eine herdförmige, lockere Fibroblastenproliferation als Zeichen einer beginnenden Fibrosierung auf. Nun war das Interstitium stark verbreitert, ödematös und von Lymphozyten, Granulozyten und Plasmazellen infiltriert.

Pneumozyten vom Typ 2 sprangen knopfförmig in das Alveolarlumen vor (Abb.15).

Die progrediente Fibrosierung des interstitiellen Lungengewebes wurde nach van Gieson in Form von rot gefärbtem, fibrillenartigem Mesenchym in den Alveolarsepten deutlich (Abb.16).

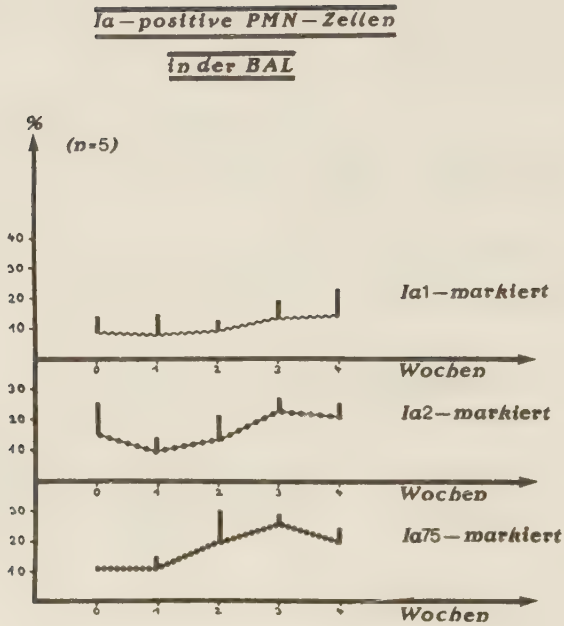


Abb. 11 Veränderungen der Zahl fluoreszenzmarkierter, polymorphnukleärer Zellen in der Lunge während 4-wöchiger Bleomycintherapie

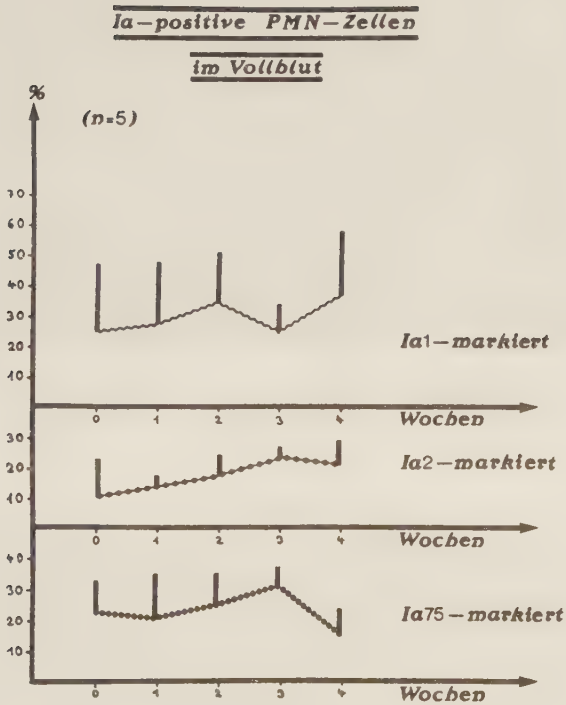


Abb. 12 Schwankungen der Anzahl fluoreszenzmarkierter, polymorphnukleärer Zellen im Vollblut während 4-wöchiger Bleomycintherapie

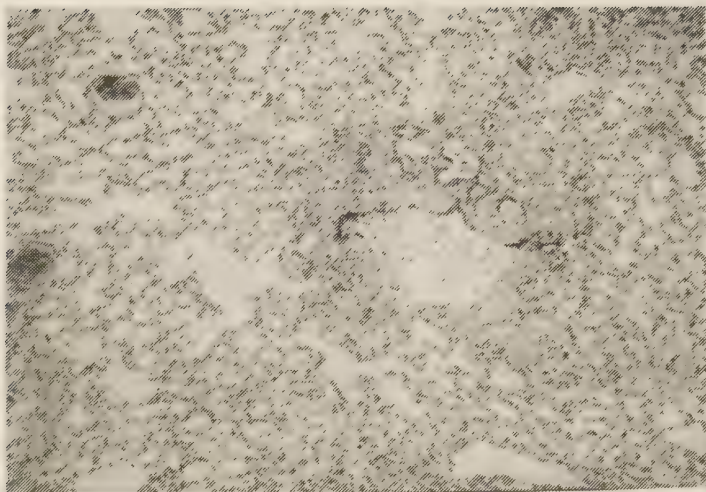


Abb. 13 Gesundes Lungenparenchym mit schmalen Alveolarsepten

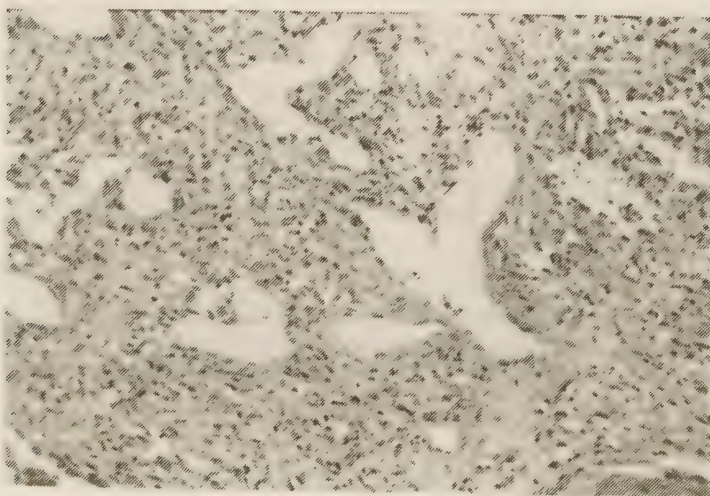


Abb. 14 Histologie einer fibrosierenden Alveolitis mit Verbreiterung der Alveolarsepten und interstitiellen, zellulären Infiltraten ohne wesentliche Fibrose

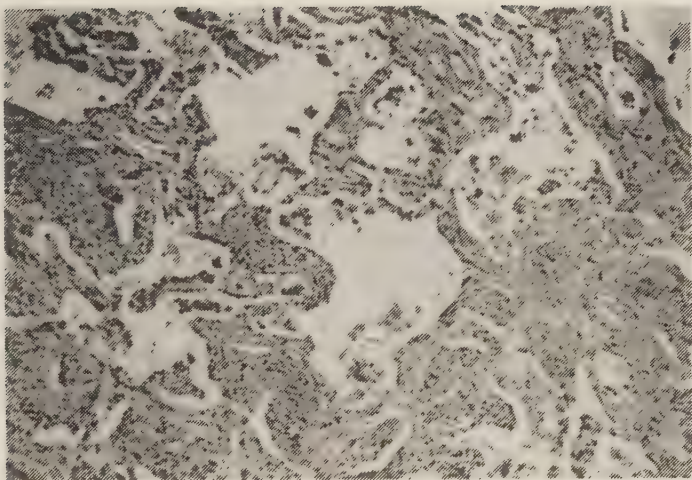


Abb. 15 Histologie einer fibrosierenden Alveolitis mit verbreiterten Alveolarsepten und Bindegewebsvermehrung - nach Pappenheim gefärbt

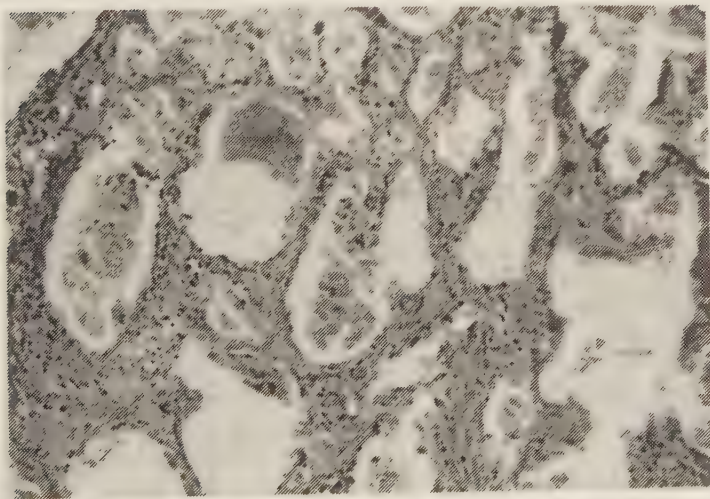


Abb. 16 Verbreiterte Alveolarsepten mit Bindegewebsvermehrung - nach van Gieson gefärbt

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methode

4.1.1 Untersuchungsobjekte

Im Vergleich zum Hund sind kleine Versuchstiere, wie Ratten oder Kaninchen, aus anatomisch-technischen Gründen zur bronchoskopischen Untersuchung weniger geeignet. Bei ihnen ist eine BAL unter Sicht nicht möglich. Einfache Eingriffe, wie eine Blutentnahme zur Erstellung eines Differentialblutbildes, erfordern schon erhebliche Erfahrung. Trotz dieser Einschränkungen erhält Bigby (4) am Kaninchen mittels eines Lavagevolumens von nur 15 ml ausreichend Zellmaterial. Thrall (75), der das dreifache Volumen bei Ratten einsetzt, bekommt dagegen nur ein Drittel des Zellmaterials pro ml zurück.

Diese Beispiele verdeutlichen, daß eine Lavage, die mit geringem Volumen und blind durchgeführt wird, zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen kann.

Die BAL am Hund, wie in unserer und in anderen Arbeiten beschrieben (27, 24, 78), ermöglicht den Einsatz eines größeren Lavagevolumens und die gezielte Lokalisation des Bronchoskops unter Sicht. Deswegen sind die Ergebnisse der BAL am Hund repräsentativer und können eher mit der BAL-Diagnostik am Menschen verglichen werden.

In der Literatur sind die Angaben über das am Hund eingesetzte Instillationsvolumen unterschiedlich. Fahey (24) appliziert 300 ml NaCl, Wulff (78) nur 200 ml. Beide erhalten jedoch etwa gleich viele Zellen. Erklärt werden kann dieses Ergebnis durch eine Studie von Davis (20). Dieser stellt fest, daß die Zellkonzentration pro ml Lavage bei einem größeren Volumen als 240 ml abnimmt. Die Gruppe um Rebar (63) setzt zur Spülung nur 50 ml ein, erhält aber ein Drittel so viele Zellen in der BAL, wie die beiden anderen Gruppen. Lam (47) stellt an gesunden Probanden fest, daß eine hohe Zellzahl bei geringem Lavagevolumen durch die Zellen bronchialer Herkunft, wie zum Beispiel Epithelien, verursacht wird. Bei einem Instillationsvolumen von 100 ml, wie in unserer Studie verwendet, nimmt der Anteil solcher Zellen stark ab. Ein weiterer Nachteil eines geringen Spül-

volumens ist außerdem, daß nur die größeren Bronchien und nicht die peripher liegenden Alveolen erreicht werden (35).

Wesentlich für die effektive Spülung ist, daß die Spitze des Gerätes in "Wedge-Position" liegt, also im betreffenden Bronchus eingekeilt ist, weil auf diese Weise lokalisiert Zellen abgeschwemmt werden und weniger NaCl vom umliegenden Lungenparenchym resorbiert wird.

4.1.2 Aufarbeitung des Zellmaterials

Der Verlust von Untersuchungsmaterial ist von besonderer Bedeutung. Die Filtration der Lavage über Gaze zur Entfernung grober Schleimpartikel ändert die Gesamt-BAL-Zellzahl nicht (47). Der Prozentsatz an Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten bleibt ebenfalls konstant. Lediglich der Anteil der Epithelien geht zurück (47). Verschiedene Autoren (18, 54, 67) beschreiben, daß durch Waschvorgänge, das heißt Suspension der BAL-Zellen mit Kochsalz und folgende Zentrifugation, zwar die Vitalität der BAL-Zellen gesteigert, die Gesamtzahl durch diesen Arbeitsvorgang jedoch gesenkt wird. Zudem wird auch die Differentialzytologie beeinflusst, weil vor allem Lymphozyten verlorengehen. Saltini (67) schreibt über diese Technik, daß im Mittel Lymphozytenverluste von 22 % auftreten. Aus diesem Grunde wurde die gewonnene BAL nicht wiederholt gewaschen, sondern die abzentrifugierten BAL-Zellen dienten ohne weitere Aufbereitung zur Erstellung von Zytozentrifugenpräparaten.

4.1.3 Beeinflussung der arteriellen Blutgaswerte

In Untersuchungen von Crystal (15) an Patienten mit IPF werden für die Mehrzahl von Probanden statistisch gesichert, niedrigere Sauerstoffpartialdrucke im Blut gemessen. Verursacht wird dies durch die Verminderung der verfügbaren Alveolo-Kapillaren-Parenchymeinheiten (36). Signifikant niedrigere pO_2 -Werte am stehenden Patienten, im Vergleich zum liegenden Patienten in anderen Studien, führt er auf günstige Beeinflussung der hämodynamischen Verhältnisse der Lunge in liegender Position zurück. Snider (71) fand während 8-wöchiger Bleomycinbehandlung am Hamster ein Absinken des Sauerstoffpartialdrucks und gleichbleibende Werte für Kohlendioxid. Ursächlich dafür ist seiner Meinung nach die während der 4. - 8. Woche weit fortgeschrittene

Lungenerkrankung mit erhöhtem Totraum, angestiegener Compliance und größerer Alveolo-arterieller-Sauerstoffdruckdifferenz (Aa DO₂). Auch in unserer Studie wurden die Auswirkungen der Durchführung einer BAL auf die Raumluftgase im Blut gemessen. So stellten wir während BAL bei gleichzeitiger Sauerstoffapplikation über den 2-lumigen Tubus höhere ($p < 0,05$) Sauerstoffpartialdrucke im Vergleich zum Ausgangswert fest. Parallel dazu zeigten die Partialdruckwerte für Kohlendioxid keine Schwankungen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen an Patienten, die während Durchführung der BAL O₂ über eine O₂-Brille insuffliert erhalten, mißt Heintz (33) signifikant höhere pO₂-Werte und konstante pCO₂-Werte nach BAL. Zudem beobachteten wir auch keine pH-Wert-Verschiebungen. Dagegen beobachtet Matsushima (50) an 2 Patientenkollektiven während Fiberbronchoskopie, über einen Tubus und andererseits über den nasalen Zugangsweg, verminderte O₂-Partialdrucke. Ursächlich für die O₂-Abnahme im Blut nennt er ein zu Ungunsten der O₂-Versorgung verändertes Ventilations-Perfusions-Verhältnis. Dies führt er vor allem auf direkten Verschluß von Bronchien zum Beispiel durch die Bronchoskopspitze der Bronchialflüssigkeit zurück. Andere Autoren führen (42, 49) weitere Gründe an, wie zum Beispiel Bronchospasmen und Irritation der Bronchialschleimhaut. Schließlich darf vermutet werden, daß der in unserer Studie festgestellte, signifikant gestiegene Sauerstoffpartialdruck zurückgeführt werden kann auf die kurze Dauer des Eingriffs und die Verwendung eines Spezialtubus mit der gleichzeitigen Möglichkeit zur Sauerstoff-Insufflation. Dieses Vorgehen führt zu einer guten Atmungsfunktion der Versuchstiere und zu einer geringen Beeinflussung der physiologischen Lungenverhältnisse.

4.2 Diskussion der Ergebnisse aus der BAL

4.2.1 Dynamik der Zusammensetzung der BAL

4.2.1.1 Kontrollen

Zur Diagnostik pathologischer BAL-Zellbilder ist es notwendig, daß die charakteristische Cytologie der BAL einer gesunden Lunge definiert ist. Costabel (11) weist orientiert an einer Auswahl von Publikationen über BAL-Normalwerte bei gesunden Nichtrauchern daraufhin, daß eine auffallend große Streuung der Absolutzahlen im Vergleich zu

der geringen Streuung bei Prozentangaben zu beobachten ist. In Übereinstimmung mit Rebar (63) und Hunninghake (35) gibt Costabel (13) für eine normale BAL folgende Prozentzahlen an:

Alveolarmakrophagen 90 %, Lymphozyten 10 %, und segmentkernige Granulozyten <1 %. Im Gegensatz dazu liegen in unserer eigenen Studie, in Übereinstimmung mit anderen Autoren (24, 18, 46), die Prozentsätze für Alveolarmakrophagen um 10 % niedriger und für die anderen Zelltypen höher.

Extreme Unterschiede vor allem im Wert für die Lymphozyten, der über 20 % beträgt, können in den Untersuchungen von Ansfield (3) und Wulff (78) festgestellt werden. Hunninghake (35), der in einer umfassenden Arbeit die BAL von gesunden Patienten untersucht, weist daraufhin, daß hauptsächlich in früheren Untersuchungen größere relative Anteile von Lymphozyten gemessen wurden. Seiner Meinung nach lag die Ursache dafür in der Verwechslung von Lymphozyten und Alveolarmakrophagen, die häufig unterschiedliche Durchmesser aufweisen und angeblich den Lymphozyten ähneln. In seiner Untersuchung nimmt er eine genaue Eingrenzung des BAL-Zellbildes vor, indem er einen Prozentsatz von 10-15 % Lymphozyten als grenzwertig hoch, aber noch normal definiert. Hunninghake (35) erwähnt auch, daß entzündliche Erkrankungen der oberen Luftwege zur Verfälschung der BAL führen können, da das Bronchoskop zur Spülung über die Epitheloberfläche der Stammbronchien bis zu den Bronchien 4. und 5. Ordnung geführt wird. Dies entspricht einer Strecke von mindestens 10 cm. Epitheloberfläche mit immunologisch aktiven Zellen wird überquert und kann über den Arbeitskanal zusätzlich der Spülflüssigkeit zugemischt werden. Durch mikroskopische Kontrollen und Antibiotikamedikation, wie in anderen Arbeiten (27, 24, 78) durchgeführt, haben wir diese Fehlerquelle ausgeschlossen.

4.2.1.2 Einfluß der Bleomycingabe

Sowohl die bronchoalveolare Verabreichung von Bleomycin, als auch die intravenöse Gabe, führen zu hohen Konzentrationen dieser toxischen Substanz in der Lunge. Es kommt zur Verletzung des Organparenchyms und reaktiv zum entzündlichen Ödem der Alveole.

Bei Persistenz der Schädigung durch die wöchentliche Bleomycinapplikation bedingt, kann dies zur Fibrosierung des Gewebes führen, die mit Hilfe der BAL dann anhand von Zellbewegungen cytologisch analysiert werden kann. Hunninghake (35) beschreibt 130 derartige interstitielle Lungengerüsterkrankungen und charakterisiert sie zusätzlich mittels der BAL-Cytologie. Crystal (16), der sich in gleichem Umfang mit diesen Erkrankungen befaßt, unterteilt in einer Studie die Entzündung der Alveolen nach dem BAL-Bild in Lymphozytenalveolitis, wenn dieser Zelltyp in der BAL vorherrscht und in Granulozytenalveolitis, wenn die Granulozyten das Bild der BAL prägen. Eine Dominanz bestimmter Zelltypen in der BAL und eine eindeutige Steigerung der Zellzahl während der Lungenerkrankung kann auch in unserer Studie festgestellt werden. Der Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen (24, 78, 63) zeigt jedoch, daß die Unterschiede hinsichtlich der Absolutzahlen ähnlich wie bei den Kontrolltieren stark voneinander abweichen. Prozentwerte von BAL-Zellen hingegen eignen sich, um die Ergebnisse verschiedener Publikationen miteinander zu vergleichen. Berücksichtigt werden müssen dabei auch die in 4.1 aufgeführten Unterschiede der Methodik.

Während Bleomycinapplikation kann in der vorliegenden Studie eine Verminderung des Anteils der Alveolarmakrophagen (AM) von 90 % auf 60 % schon in der 1. Woche gemessen werden. Die Absolutzahlen dieses Zelltyps schwanken während der ersten Behandlungswochen nur unwesentlich. Sie nehmen jedoch in der 4. Woche ebenfalls signifikant ($p < 0,05$) ab. Thrall (75) mißt dagegen eine gleichbleibende Absolutzahl von AM und in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen stellt er einen gesunkenen Anteil schon nach dem 3. Tag der Bleomycinbehandlung fest. Einen gegenüber dem Ausgangswert verminderten AM-Anteil beobachtet Fahey (24) erst nach 4-wöchiger Bleomycinbehandlung. Bigby hingegen sieht nach 3-wöchiger Bleomycinapplikation eine 4-fache Zunahme der AM-Zahl. An Rauchern werden Anstiege dieses Zelltyps ebenfalls beobachtet (19). Unsere Messungen weisen für die Lymphozyten bereits während der 1. Woche, noch vor den neutrophilen Granulozyten, auf eine Zunahme der Absolutzahl und des Prozentwertes hin. In der Studie von Thrall (75) und der von Bigby (4) steigen zunächst während der ersten 3 Tage die absoluten und prozentualen Werte für die neutrophilen Granulozyten an. Thrall (75) kann einen Anstieg der Abso-

lut- und Relativzahlen der Lymphozyten erst nach einer Zunahme der neutrophilen Granulozyten dokumentieren. Dagegen zeigen Bigbys (4) Messungen keine Veränderungen im Verlauf der Lymphozytenwerte, und auch Fahey (24) stellt keine Abweichungen fest. Anhand unserer Daten kann außerdem beobachtet werden, daß erst während der 2. Woche, also nach der Steigerung der Lymphozytenzahlen, eine Erhöhung der Werte der neutrophilen Granulozyten erfolgt. Fahey (24) mißt eine solche Zunahme zu einem späteren Zeitpunkt. Wie erwähnt, beobachteten Bigby (4) und Thrall (75) dies schon nach 3 Tagen Bleomycinapplikation. Die angeführten Daten zeigen, daß Veränderungen der alveolaren Zellpopulation als initiale Reaktion des Organs mit Hilfe der BAL erfaßt werden können. Unterschiedliche Ergebnisse bestehen jedoch hinsichtlich des Zelltyps, der als erster am Ort der Verletzung erscheint. Die Bedeutung der angeführten Daten liegt aber nicht nur in der Aufklärung der Pathogenese solcher Krankheitsprozesse, sondern vor allem in der Früherkennung (9, 29) und der rechtzeitigen Therapie (30, 7) einer solchen Erkrankung.

4.2.2 Kollagenaseaktivität in der zellfreien Lavage und Zusammenhang mit der beobachteten Zelldynamik in der BAL

4.2.2.1 Kontrolluntersuchungen

Die Kollagentypen 1 und 3 kommen im Interstitium der Lunge vor. Typ 4 ist Teil der Basalmembran des Alveolarepithels. Diese organischen Substanzen werden von spezifischen Enzymen, den Kollagenasen, ab- und umgebaut, die nach Hunninghake (36) in der BAL des gesunden Menschen selten vorgefunden werden. Dagegen konnten wir bei den gesunden lavagierten Tieren Enzymaktivitäten der Kollagenasen feststellen. Alle drei Enzymtypen erfuhren jedoch während des Beobachtungszeitraums keine wesentlichen Schwankungen. Auch die Zellzahl in der BAL, wie unter 4.2.1 beschrieben, veränderte sich nicht gravierend. Hunninghake (35, 36) und Crystal beschreiben in ihren Untersuchungen, daß vor allem neutrophile Granulozyten für die Produktion von Kollagenasen verantwortlich sind. Die Durchführung einer wöchentlichen Spülung führt nach vorliegenden Ergebnissen nicht zur Zu-

nahme der Zahl neutrophiler Granulozyten. Auch der Zellmetabolismus wird in geringem Maß beeinflusst, so daß es nicht zum Anstieg spezifischer Enzymaktivitäten wie der gemessenen Kollagenasen kommt.

4.2.2.2 Einfluß der Bleomycinmedikation

Endobronchiale Bleomycinapplikation führt zu einer nachhaltigen Schädigung des Lungenparenchyms. Mesenchymale Reparaturmechanismen wie die Synthese von spezifischen Kollagenasen werden ausgelöst. So zeigen die Kollagenasen Typ 1 und 3, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen, eine Zunahme der Enzymaktivität während der 1. Woche, die bis zum Ende des 8-wöchigen Untersuchungszeitraumes erhöht bleibt. Der Wert der Kollagenase Typ 4 hingegen sinkt ab der 4. Beobachtungswoche bis zum Ende der 8. Woche. Quinones und Crouch (60) haben ebenfalls die Verläufe der Kollagenasen gemessen und beobachteten Werte, die mit denen der vorliegenden Studie übereinstimmen. Im Unterschied zu unserer Arbeit führten sie die BAL über einen Zeitraum von 10 Tagen an Ratten durch. Durch die Messung von radioaktiv-markiertem Kollagen Typ 1 und 3 stellen sie während Bleomycinbehandlung eine quantitative Zunahme um das Dreifache relativ zu den nicht behandelten Kontrollen fest. Begleitet wird diese extreme Steigerung von einem Anstieg der Granulozytenzahl in der BAL. Da dieser Zelltyp (16, 36) Kollagenasen sezerniert, kann geschlossen werden, daß die Zunahme der Enzymaktivität vor allem auf Grund der Erhöhung der Granulozytenzahl erfolgt. So weisen verschiedene Untersuchungen (21, 35) daraufhin, daß die vermehrte Einwanderung von Entzündungszellen in die Alveolen, wie zum Beispiel der erwähnten Granulozyten, durch chemotaktisch wirkende Enzyme, die auf Grund der gesetzten Läsion freigesetzt werden, verursacht wird. Nach vorliegenden Messungen stellten wir eine Abnahme von Kollagentyp 4 bis zum Untersuchungsende fest. Quinones und Crouch (60) beobachteten ebenfalls, im Vergleich zur Kontrolle, eine Abnahme von Kollagen-Typ 4. Als Ursache dafür vermuten sie, daß die Resynthese dieses Kollagens, das sich im Alveolarepithel befindet, aufgrund des alveolaren Bleomycinschadens gestört ist. Inwieweit noch andere Zellen des Lungenparenchyms, wie zum Beispiel die Alveolarmakrophagen und das von diesen produ-

zierte IL-1, an den Enzymveränderungen beteiligt sind, ist aufgrund unserer Studie und anderer Arbeiten nicht festzustellen (14, 15, 28, 45, 61, 67).

4.2.3 Zelldynamik im Vollblut und Zusammenhang mit der Zelldynamik in der BAL während Bleomycinbehandlung

Der Verlauf bestimmter Zelltypen in der BAL im Vergleich zum Vollblut ist Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen, vor allem über Lungenerkrankungen, wie Sarkoidose, IPF und Hypersensitivitätspneumonie. So beobachtet Ginns (31) in seiner Arbeit über die IPF und Sarkoidose krankheitsspezifische Zellverläufe in der BAL und im Vollblut. Er mißt für die mit monoklonalen Antikörpern markierten Lymphozyten in der BAL von IPF-Kranken eine niedrigere Anzahl als im Vollblut. Zudem stellt er unterschiedliche Verläufe der Lymphozytensubpopulationen, wie der Okt-4-positiven Helfer- und Okt-8-positiven Suppressor-Zellen fest. So kommen höhere prozentuale Anteile der Okt-4-positiven Zellen im Blut vor. In der BAL hingegen ist die Anzahl der Okt-4-positiven Zellen vermindert und die der Okt-8-positiven Zellen erhöht. Im Gegensatz dazu sind bei Sarkoidoseerkrankten im peripheren Blut sämtliche Lymphozytenuntergruppen vermindert. In der bronchoalveolaren Cytologie zeigen sich erhöhte Werte für die Gesamtzahl der Lymphozyten, wobei relativ höhere Werte für die Helferzellen vorliegen. Crystal (16) stellt in einer umfassenden Untersuchung über die Sarkoidose- und Hypersensitivitätspneumonie fest, daß beide Krankheitsbilder identische Zellbefunde in der BAL und im Vollblut zeigen. So beobachtet er eine Steigerung der Anzahl von bronchoalveolaren Lymphozyten und eine Verminderung der Werte dieses Zelltyps oder auch eine normale Anzahl dieser Zellsubpopulation im Blut. Anhand seiner Untersuchungen belegt Crystal (16), daß es zur Verschiebung der prozentualen Anteile typischer Zellen im Lungenparenchym kommt. So sind vermehrt immunologisch aktive Entzündungszellen, die sogenannten Effektorzellen, vorhanden. Er nimmt an, daß Zellen aus dem Blut in ein anderes Kompartiment, nämlich die Lunge, abwandern. Diese Vermutung wird durch unsere Messungen an der bleomycininduzierten Lungenerkrankung unterstützt. So steigen die Zahlen für Lymphozyten und segmentkernige Granulozyten im Vollblut erst zu einem späteren Zeitpunkt an, als das für die jeweils spezifischen BAL-Zellen der Fall ist. Wahrscheinlich führt die

lokale Störung physiologischer Lungenverhältnisse mit Rekrutierung spezieller Leukozytensubpopulationen aus dem peripheren Blut zu systemischen Auswirkungen. Eine knochenmarktoxische Wirkung von Bleomycin und eine dadurch verursachte Suppression bestimmter Zelltypen im Blut kann nach einer Untersuchung von Blum (5) ausgeschlossen werden. Es gibt keinen Nachweis für eine mit der Droge zusammenhängende hämatologische Erkrankung. So kann im Blut von Bleomycinbehandelten Tumorpatienten lediglich eine vorübergehende Thrombopenie festgestellt werden. Crystal und Hunninghake (35) beobachten in einer weiteren Studie an IPF-Patienten erhöhte Granulozytenwerte in der BAL. Ursächlich für die Einwanderung dieser Zellen sind ihrer Meinung nach aktivierte Makrophagen, die einen auf Granulozyten chemotaktisch wirkenden Faktor produzieren und von Thrombozyten produzierte Eikosanoide. Diese Substanzen regulieren, welche Entzündungszellen in das Lungenparenchym wandern. Von Makrophagen und Lymphozyten produziertes Interleukin 1 aktiviert Bindegewebsfibroblasten und steigert ebenfalls die Chemotaxis. Proteasen, die von Granulozyten und Makrophagen sezerniert werden, tragen einerseits zur Zerstörung des physiologischen Gleichgewichts der Bindegewebsproduktion bei, andererseits schädigen sie direkt Endothel- und Epithelzellen der Lunge. Welche Zelltypen und Substanzen zusammenwirken, kann auf Grund experimenteller Ergebnisse vermutet werden. Der genaue Entstehungsmechanismus einer Lungengerüsterkrankung im Zusammenhang mit Zellbewegungen im Vollblut ist jedoch nicht geklärt.

4.2.4 Immunologische Bedeutung fluoreszenzmarkierter Zellen während Bleomycinapplikation

4.2.4.1 In der BAL

Auf immunologisch aktiven Makrophagen, Lymphozyten und unreifen Granulozyten können Membranrezeptoren mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers, Ia, markiert werden. Diese aus Proteinen bestehenden Rezeptoren der Zelloberfläche dienen als Antigenerkennungsregion und ermöglichen dem Organismus eine gezielte Abwehrreaktion. Sie sind auf Genorten der Klasse 2 des Major-Histokompatibilitätskomplexes kodiert. Diese spezifischen, die Antigenität der Zellen festlegenden Proteinstrukturen bestehen nach Hocking (34) aus einer und -Kette. Auch Claesson-Welsh stellt diese

beiden Untereinheiten fest. Sie hat jedoch gemessen, daß noch eine dritte, sogenannte γ -Kette von Bedeutung ist, da diese die Synthese der beiden Untereinheiten des Ia-positiven Proteinkomplexes beschleunigt (10). In Übereinstimmung mit einer Arbeit von Wulff (78), ebenfalls an Hunden, messen wir insgesamt 90 % Ia-positive Alveolarmakrophagen. Polymorphnukleäre Zellen sind circa 40 % in der BAL vertreten. Diese Anzahl stimmt mit den Werten aus Studien an Patienten mit Sarkoidose oder exogen allergischer Alveolitis (EAA) überein (15, 19, 31, 35). Auch Costabel (13) stellt fest, daß aktivierte BAL-Zellen Ia-markierte Zellmembranstrukturen exprimieren. Zusammenfassend charakterisiert er das immuncytologische Profil in der BAL von Patienten mit immunologischen Lungenerkrankungen durch die Spezifizierung von Leukozytenuntergruppen mittels monoklonaler Antikörper. Er mißt spezielle Lymphozytensubpopulationen, wie Helfer und Suppressorzellen, während in der vorliegenden Studie die Verläufe Ia₁, -Ia₂- und Ia₇₅-positiver Zellen analysiert werden. Hier ist eine zunehmende Aktivierung der Alveolarmakrophagen und PMN-Zellen in Form einer signifikanten Steigerung Ia₁- und Ia₂-positiver Alveolarmakrophagen und PMN-Zellen feststellbar. Auch Ia₇₅-positive PMN-Zellen nehmen zu. Dagegen sinken schon während der 1. Woche Ia₇₅-markierte Alveolarmakrophagen ab. Anhand dieser Resultate kann vermutet werden, daß eine Untergruppe von Alveolarmakrophagen abnimmt. Bestätigt und erklärt werden die gleichzeitige Erhöhung der von uns beobachteten Ia-positiven Alveolarmakrophagen und PMN-Zellen durch Studien von Fischer (26) und Puri (59). Sie untersuchen Faktoren, die die Antigenpräsentation durch Zellen beeinflussen. Es wird postuliert, daß Lymphokine zur Aktivierung von AM führen, diese produzieren Proteinkomplexe, welche wiederum PMN-Zellen dazu anregen, Ia-positive Zellmembrankomplexe zu exprimieren.

4.2.4.2 Im Vollblut

Aus Arbeiten von Costabel (11, 12) an Patienten mit Sarkoidose und EAA ist bekannt, daß während veränderter Verläufe von aktivierten BAL-Zellen keine Schwankungen im Blut beobachtet werden. Auch White (77) mißt an AIDS-Patienten in der BAL einen Anstieg der Lymphozytenzahlen, jedoch eine gleichbleibende Zusammensetzung der Differentialzytologie im Blut. Dagegen erfahren in unserer Studie mit Ia₁- und

Ia₂-Antikörpern markierte PMN-Zellen im Blut eine signifikante Zunahme. Ia₇₅-positive PMN-Zellen sinken dagegen ab. Daraus kann gefolgert werden, daß der Bleomycinschaden des Lungenparenchyms in der Lunge und im Blut zur Aktivierung ganz spezifischer Leukozytensubpopulationen führt, was in Form einer Zunahme Ia-positiver, gleichsam immunologisch aktiver Zellen, gemessen wird.

4.2.5 Lungenhistologie ohne und nach endotrachealer Bleomycininstillation

Die zytostatikainduzierte Lungenschädigung stellt eine seltene, aber klinisch wichtige Komplikation der Tumorchemotherapie dar. Betroffen ist das Lungenparenchym vor allem deshalb, weil speziell Bleomycin hohe Konzentrationen in diesem Gewebe erreicht (5, 41). Eine endgültige Sicherung der Diagnose ist nur durch eine Lungenbiopsie möglich.

Die Lungenhistologie unserer gesunden Kontrolltiere und anderer Tierarten ist, wie beim Menschen, durch schmale Alveolarsepten charakterisiert. Im Gegensatz dazu zeigt die bleomycingeschädigte Lunge typische histologische Bilder, die aber nicht spezifisch sind, und unter anderem auch im Schock (52, 53) durch Einfluß von O₂-Radikalen (43, 68) und bei Paraquatinoxikation (25) auftreten, da diesen Prozessen ein gleichartiges pathogenetisches Prinzip zugrunde liegt. Die bleomycininduzierte Zerstörung des Gewebes wird vermutlich durch eine direkte toxische Reaktion der Noxe ausgelöst. Außerdem werden in der Literatur auch noch andere Mechanismen, die zu diesen Parenchymveränderungen der Lunge führen, diskutiert (2). Durch das Polypeptid Bleomycin verursachte immunologische Prozesse könnten Auslöser des Gewebeschadens sein. Bestätigung hat diese Theorie jedoch bisher nicht gefunden. Auch ein durch Antikörper verursachter Schaden wird eher nicht vorliegen, da mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen bisher keine Antigen-Antikörper-Komplexe in den verletzten Alveolen vorgefunden wurden. Wie die histologischen Präparate der 4. Woche zeigen, bewirkt die Noxe zunächst eine diffuse alveolare Schädigung. Zuerst ist das Endothel der Alveolen und Kapillaren betroffen. Schneeberger (74) beschreibt, daß es zur Dehiszenz der nur locker miteinander verbundenen Endothelzellen kommt. Folgend tritt Flüssigkeit und Eiweiß aus dem Gefäßlumen in das Interstitium über. Histologisch

stellt sich dies als ödematös entzündliche Verbreiterung der Alveolarsepten dar. Nekrosen der Endothelien führen zudem zur Mikrothrombenentstehung (25). Untersuchungen von Gebbers (29) zufolge kann die Mikrothrombosierung durch prophylaktische Antikoagulantientherapie bei bleomycinbehandelten Patienten verhindert werden. Eine Lungenschädigung ist dann auch nicht nachweisbar. Der festere Zusammenhang zwischen den Alveolarepithelien durch Desmosomen wird später als die feinere Endothelzellverbindung aufgebrochen. Pneumozyten-Typ 1 werden geschädigt. Fleischmann (27) beobachtet die Schädigung der Basalmembranen der alveolaren Epithel-Endothel-Barriere, die er den Auswirkungen von Bleomycin auf die DNA der betroffenen Zellen durch Sauerstoffradikale zuschreibt. Es kommt zu Nekrosen, zur Ausbildung eines fibrinösen Ödems und reaktiven Proliferation von Pneumozyten-Typ 2. Diese in der 8. Beobachtungswoche unserer Studie auftretende, histologische Phase mündet, wie in der Literatur beschrieben, in ein irreversibles Stadium mit interstitieller und intraalveolarer Fibrose ein.

4.2.6 Vergleich von Zytologie und Histologie

Haslam (32) und Hunninghake (36) beobachteten, übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, bei Patienten mit Sarkoidose und Lungenfibrose eine hohe Kongruenz zwischen der BAL und den Biopsien. Dies stellen Abe (1) und Semenzato (69) ebenfalls beim Vergleich der transbronchialen Lungenbiopsie und BAL an Sarkoidosepatienten fest. In einer weiteren Gegenüberstellung beider Methoden erhält Semenzato mittels immunologischer Verfahren entsprechende Ergebnisse. Zudem beobachtet er auch, daß bei starken alveolaren Entzündungen mit über 35 % Lymphozyten in der BAL die Zahl der Lymphozyten im Vergleich zur Histologie zu hoch gemessen wird, die der Makrophagen dagegen zu niedrig. Trotzdem reflektiert gemäß seinen Ergebnissen die BAL die histologischen Verhältnisse sehr genau. Ray (62), der 460 offene Lungenbiopsien durchgeführt hat, ist der Meinung, daß diese Methode am besten zur Materialgewinnung aus der Lunge geeignet ist. Turner-Warwick weist dagegen daraufhin, daß die BAL eine Zellentnahme von einem größeren Areal ermöglicht und daher genauer als die histologischen Schnitte Auskunft über Prozesse im Lungenparenchym gibt. Die vorliegende Studie zeigt, daß die histologisch diagnostizierte Lungengerüstveränderung auch mit Hilfe der Cytologie aus der BAL be-

obachtet werden kann. Mit der BAL werden immunologisch aktive Zellen von der Oberfläche der Alveolen gespült. Das gewonnene Material entspricht der zellulären Zusammensetzung im Lungenparenchym, da sich die Zellen der Alveolaroberfläche im Gleichgewicht mit den Zellen des Interstitiums befinden. So sind in der BAL vor allem Lymphozyten vorzufinden, während gleichzeitig histologisch eine Entzündung des interstitiellen Lungengerüsts festgestellt werden kann. In einer späteren Krankheitsphase dominieren segmentkernige Granulozyten in der Lavage, während in der Histologie eine fibrosierende Alveolitis zu beobachten ist. Folglich wird die Sequenz der histologisch feststellbaren Ereignisse durch die BAL-Zellen im Verlauf dokumentiert. Die Früherkennung von Entzündungszellen durch die Spülung ist hierbei schon in der Initialphase der 1. Woche möglich. Histologisch werden, wie auch von anderen Autoren (25, 74) bestätigt, Veränderungen erst zu einem späteren Zeitpunkt erkennbar.

5. Zusammenfassung

Durch endobronchiale Applikation von Bleomycin (2 mg/kg Körpergewicht) wurde im Tierversuch eine interstitielle Lungenerkrankung induziert. Das Medikament erhielten 5 Hunde einmal wöchentlich über insgesamt 8 Wochen im Anschluß an eine bronchoalveolare Lavage instilliert. Nach jeder 4. Lungenspülung wurde eine offene Lungenbiopsie durchgeführt. 5 Kontrolltiere bekamen physiologische NaCl-Lösung als Placebo.

- A. Kontinuierliche Bleomycinbehandlung führte zu einer histologisch gesicherten lympho-granulozytären Entzündungsreaktion der Alveolen. Parallel dazu war, ausgehend von einem Normalbefund der BAL, eine Erhöhung der Gesamtzellzahl zu beobachten. In der bronchoalveolaren Spülflüssigkeit war schon während der 1. Woche die Zahl der Lymphozyten und bis zur 2. Woche die Anzahl der Granulozyten gestiegen. Nach 8-wöchiger Beobachtungszeit war die Gesamtzellzahl in der BAL bei weiterhin erhöhten prozentualen Werten für Lymphozyten und Granulozyten wieder gesunken. Gleichzeitig konnte histologisch eine Lungenfibrose festgestellt werden. Die Kontrollen zeigten während des gesamten Beobachtungszeitraums weder histologisch noch cytologisch feststellbare Lungenparenchymveränderungen.
- B. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe konnten während Zytostatikabehandlung Schwankungen spezifischer, mit monoklonalen Antikörpern markierter Zellen in der BAL und im Vollblut gemessen werden. Über eine 4-wöchige Beobachtungszeit nahmen Ia₁- und Ia₂-positive Zellen der Lavage und aus dem Blut zu. Ia₇₅-positive Zellen hingegen sanken während der 4. Woche ab.
- C. Unter Bleomycinapplikation war in der Lavage eine gesteigerte Aktivität der Kollagenasen Typ 1 und 3 nur in der 3. Woche festzustellen. Dagegen nahm die Kollagenase Typ 4 während der 5. Woche signifikant ab.

D. Während der BAL bei gleichzeitiger Sauerstoffinsufflation wurden im Vergleich zum Ausgangswert jeweils höhere Sauerstoffpartialdrucke gemessen. Kohlendioxidpartialdrucke und pH-Werte zeigten keine untersuchungsbedingten Schwankungen.

Ausblick:

Mittels BAL konnten Veränderungen des alveolaren Zellspektrums während einer Lungengerüsterkrankung ohne nachteilige Effekte auf physiologische Blutgaswerte zu einem früheren Zeitpunkt als die jeweils kongruierenden histologischen Befunde festgestellt werden. Während die Bedeutung von veränderten Zellrezeptoren immunologisch aktiver Zellen und der Freisetzung spezifischer Proteine und Mediatoren durch alveolare Zellen zur Zeit nicht überschaubar ist, wird die BAL vermutlich auf dem Gebiet der Ätiologie und schließlich der Therapie von Lungengerüsterkrankungen an Bedeutung gewinnen.

6. Literaturverzeichnis

1. Abe S., Munakata M., Nishimura M., Tsueta Y.,
Terai T., Nakano I.:
Gallium-67 scintigraphy, bronchoalveolar lavage and
pathologic changes in patients with pulmonary
sarcoidosis
Chest 85: 650-655 (1984)
2. Adamson I.Y., Bowden D.:
The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary
fibrosis in mice
Am J Path. 77, 2: 185-190 (1974)
3. Ansfield M.J., Kaltreider H.B., Benson B.J.,
Shalaby M.R.:
Canine surface active material and pulmonary lymphocyte
function: studies with mixed-lymphocyte culture
Exp Lung Res 1: 3-11 (1980)
4. Bigby T.D., Allen D., Leslie C.G., Henson P.M.,
Cherniack R.M.:
Bleomycin-induced lung injury in the rabbit
Am Rev Respir Dis 132: 590-595 (1985)
5. Blum R.H., Carter S.K., Arge K.:
A clinical review of bleomycin
Cancer 31: 903-914 (1973)
6. Böyum A.:
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from
human blood
Scand J Clin Lab Invest 21, 97: 77-89 (1968)
7. Brown L.D., Reimer R.R., Ahmad M., Hewlett J.S.:
Successful treatment of bleomycin lung
Cleveland Clinic Quarterly 47, 2: 97-100 (1980)
8. Burger R.:
Genetische Aspekte der Immunabwehr
Die gelben Hefte 26: 1-10 (1986)
9. Burkhardt A., Gebbers J.O., Höltje W.J.:
Die Bleomycin-Lunge
Deutsch med Wschr 102: 281-289 (1977)

10. Claesson-Welsh L., Peterson P.A.:
Implications of invariant γ -chain on the intracellular transport of class 2 histocompatibility antigens
J of Immunol 135: 3551-3554 (1986)
11. Costabel U.:
Technik und Methodik der bronchoalveolären Lavage bei interstitiellen Lungenkrankheiten
Schweiz med Wochenschr 116: 1238-1244 (1986)
12. Costabel U., Bross K.J., Mattys H.:
Bronchoalveoläre Lavage: Klinische Bedeutung zytologischer und immunologischer Befunde
Prax Klin Pneumol 39: 343-355 (1985)
13. Costabel U., Bross K.J., Rühle K.H., Löhr G.W., Matthys H.:
Ia-like antigens on T-cells and their subpopulations in pulmonary sarcoidosis and in hypersensitivity pneumonitis
Am Rev Respir Dis 131: 337-342 (1985)
14. Crystal R.G.:
Lung collagen: definition, diversity and development
Federation Proc 33: 2248-2255 (1974)
15. Crystal R.G., Fulmer J.D., Roberts W.C., Moss M.L., Line B.R., Reynolds H.Y.:
Idiopathic pulmonary fibrosis
Ann Int Med 85: 769-788 (1976)
16. Crystal R.G., Gadek J.E., Ferrans V.J., Fulmer V.D., Line B.R., Hunninghake G.W.:
Interstitial lung disease: current concepts of pathogenesis, staging and therapy
Am J Med 70: 542-568 (1981)
17. Dalton M., Rigby C.S., Grogan J.B.:
T-lymphocyte-analysis in the early diagnosis of adult respiratory distress syndrome
J Thorac Cardiovasc Surg 88: 519-521 (1984)
18. Daniele R.P., Elias J.A., Epstein P.E., Rossman M.D.:
Bronchoalveolar lavage: role in the pathogenesis, diagnosis and management of interstitial lung disease
Ann Intern Med 102: 93-108 (1985)

19. Dauber J.H., Rossman M.D., Daniele R.P.:
Bronchoalveolar cell population in accute sarcoidosis:
observations in smoking and nonsmoking patients
J Lab Clin Med 94: 862-871 (1979)
20. Davis G.S., Giancola M.S., Constanza M.C., Low R.B.:
Analyses of sequential bronchoalveolar lavage samples
from healthy human volunteers
Am Rev Respir Dis 126: 611-616 (1982)
21. Du Bois R.M.:
The alveolar macrophage
Thorax 40: 321-327 (1985)
22. Effros R.M., Mason G.R.:
An end to ARDS
Chest 89: 162-163 (1986)
23. Emslander H.P.:
Einsatz der Fiberbronchoskopie in der Intensivmedizin
Intensivbehandlung 11: 52-57 (1986)
24. Fahey P.J., Utell M.J., Mayewski R.J., Wandtke J.D.,
Hyde R.W.:
Early diagnosis of bleomycin pulmonary toxicity using
bronchoalveolar lavage in dogs
Am Rev Respir Dis 126: 126-130 (1982)
25. Fischer G., Wöltjen H.H., Schauer A.:
Lungenschäden durch Zytostatika und Paraquat
Röntgen-Bl. 34: 331-337 (1981)
26. Fischer H.G., Reske-Kunz A.B., Spaeth E., Rüde E.:
Bone marrow macrophages induced to antigen presentation
by lymphokines interact selectively with distinct
T-cells
Eur J Immunol 15: 957-960 (1985)
27. Fleischmann R.W., Baker J.R., Thompson G.R.,
Schaepfi U.H., Illievski V.R., Cooney D.A., Davis R.D.:
Bleomycin-induced interstitial pneumonia in dogs
Thorax 26: 675-682 (1971)
28. Fritz H.:
Vortrag zum 7. Interantionalen Symposium über aktuelle
Probleme der Notfallmedizin und Intensivtherapie über
das Thema:
Zelluläre und humorale Aspekte beim Schock (1986)

29. Gebbers J.O., Burkhardt A.:
Die Bleomycin-Lunge als Modell der Schocklunge
Verh Dtsch Ges Path 62: 390 (1978)
30. Gebbers J.O., Burkhardt A., Höltje W.J.:
Themengruppe: Zell- und Organveränderungen als
Therapiefolge
Verh Dtsch Ges Path 59: 561 (1975)
31. Ginns L.C., Goldenheim P.D., Burton R.C., Colvin R.B.,
Miller L.G., Goldstein G., Hurwitz C., Kazemi H.:
T-lymphocyte subsets in peripheral blood and lung la-
vage in idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis:
analysis by monoklonal antibodies and flow cytometry
Clin Immunol Immunopathol 25: 11-20 (1982)
32. Haslam P.L., Turton C.W.G., Heard B., Lukoszek A.,
Collins J.V., Salsbury A.J., Turner-Warwick M.:
Bronchoalveolar lavage in pulmonary fibrosis:
comparison of cells obtained with lung biopsy and
clinical features
Thorax 35: 9-18 (1980)
33. Heintl H.W.:
Fiberbronchoskopie in Anaesthesie und Intensivmedizin-
Komplikationen und ihre Vermeidung
Intensivbehandlung 11: 69-72 (1986)
34. Hocking W., Billing R., Foon K., Golde D.:
Human alveolar macrophages express Ia-like antigens
Blood 58: 1040-1042 (1981)
35. Hunninghake G.W., Gadek J.E., Lawley T.J., Crystal
R.G.:
Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of
patients with idiopathic pulmonary fibrosis
J Clin Invest 68: 259-269 (1981)
36. Hunninghake G.W., Gadek J.E., Kawanami O., Ferrans V.J.,
Crystal R.G.:
Inflammatory and immune processes in the human lung in
health and disease:
evaluation by bronchoalveolar lavage
Am J Pathol 97: 149-205 (1979)
37. Huzly A.:
Experiences avec le bronchoscope souple
Med Hyg 1009: 674-676 (1972)

38. Idell S., Kucich U., Fein A., Kueppers F., James H.L., Walsh P.N., Weinbaum G., Colmann R.W., Cohen A.B.:
Neutrophil elastase-releasing factors in bronchoalveolar lavage from patients with adult respiratory distress syndrome
Am Rev Respir Dis 132: 1098-1105 (1985)
39. Ikeda S.:
Atlas of flexible bronchoscopy
Thieme, Stuttgart, 177-220 (1974)
40. Joka T., Obertacke U., Pison U., Neudeck F., Keinecke K.O.:
Die bronchoalveoläre Lavage als Diagnostikum in der Intensivtherapie
Anäst Intensivther Notfallmed 20: 79-83 (1985)
41. Jones A.W.:
Bleomycin lung damage:
the pathology and nature of the lesion
Br J Dis Chest 72: 321-326 (1978)
42. Katz A.S., Michelson E.L., Stawicki J., Holford F.D.:
Cardiac arrhythmias: frequency during fiberoptic bronchoscopy and correlation with hypoxemia
Arch Intern Med 141: 603-606 (1981)
43. Katzenstein A.L.A., Bloor C.M., Leibow A.A.:
Diffuse alveolar damage-the role of oxygen, shock and related factors
Am J Path 85: 210-222 (1976)
44. König G., Luderschmidt C., Hammer C., Adelman-Grill B.C., Braun-Falco o., Fruhmant G.:
Lung involvement in scleroderma
Chest 85: 318-324 (1984)
45. Kravis T.C., Ahmed A., Brown T.E., Fulmer J.D., Crystal R.G.:
Pathogenic mechanisms in pulmonary fibrosis
J Clin Invest 58: 1223-1232 (1976)
46. Krombach F., König G., Wanders A., Lersch C., Hammer C.:
Effect of repeated bronchoalveolar lavage on free lung cells and peripheral leukocytes
Transplant Proc 27: 2134-2136 (1985)

47. Lam S., Le Riche J.C., Kijek K.:
Effect of filtration and concentration on the
composition of bronchoalveolar lavage fluid
Chest 87: 740-742 (1985)
48. Landauer B., Schmid T.O.:
Zum Einsatz der Fiberbronchoskopie in der Anästhesie
Intensivbehandlung 11: 58-68 (1986)
49. Lindholm C.E., Ollman B., Snyder J.V., Millen E.G.,
Grenvik A.:
Cardiorespiratory effects of flexible fiberoptic
bronchoscopy in critically ill patients
Chest 74: 362-368 (1978)
50. Matsushima Y., Jones R.L., King E.G., Moysa G.,
Alton J.D.M.:
Alterations in pulmonary mechanics and gas exchange
during routine fiberoptic bronchoscopy
Chest 2: 184-188 (1984)
51. Meier-Sydow J., Kronenberger H., Nerger K., Rust M.:
Neue Entwicklungen auf dem Gebiet der interstitiellen
Lungenerkrankungen
Med Klin 76: 676-682 (1981)
52. Mittermayer C., Ostendorf P., Riede U.N.:
Pathologisch-anatomische Untersuchungen bei der respi-
ratorischen Insuffizienz durch Schock.
1. Lichtmikroskopische und biochemische Analyse
Intensivmed 14: 252-262 (1977)
53. Mittermayer C., Riede U.N., Herzog H., Wichert P.,
Riesner K.:
Schocklunge
Verh Dtsch Path Ges 62: 11-65
54. Mordelet-Dambrine M., Arnoux A., Stanislas-Leguern G.,
Sandron D., Chretien J., Huchon G.:
Processing of lung lavage fluid causes variability in
bronchoalveolar cell count
Am Rev Respir Dis 130: 305-306 (1984)
55. Myrvik Q.N., Leake E.S., Fariss B.:
Studies on pulmonary alveolar macrophages from the
normal rabbit: a technique to procure them in a high
state of purity
J Immunol 86: 128-132 (1960)

56. Nakhosteen J.A., Sack H.:
Fiberbronchoskopie: Trendanalyse nach 100 und 500
Untersuchungen
Med Welt 29: 1688-1690 (1978)
57. Obertacke U., Joka T., Pison U., Riewendt H.D.,
Stimming W.:
Normalwerte der Zellverteilung und Funktion in der
menschlichen Alveole. Die bronchoalveolare Lavage
als Diagnostikum in der Intensivmedizin
Anäst Intensivther Notfallmed 22: 224-228 (1987)
58. Parsons P.E., Fowler A.A., Hyers T.M., Henson P.M.:
Chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid
from patients with adult respiratory distress syndrome
Am Rev Respir Dis 132: 490-493 (1985)
59. Puri J., Abromson-Leemann S., Cantor H.:
Antigen-processing by macrophages: definition of the
ligand recognized by T-inducer cells
Eur J Immunol 15: 362-368 (1985)
60. Quinones F., Crouch E.:
Biosynthesis of interstitial and basement membrane
collagens in pulmonary fibrosis
Am Rev Respir 134: 1163-1171 (1986)
61. Ramadori G., Rieder H., Meuer S., Meyer K.H.:
Interleukin-1: ein neues Hormon
Dtsch med Wschr 111: 1032-1038 (1986)
62. Ray J.F., Lawton B.R., Myers W.O., Toyama W.M.,
Reyes C.N., Emanuel D.A., Burns J.L., Pederson D.P.,
Dovenbarger W.V., Wenzel F.J., Sautter R.D.:
Open pulmonary biopsy
Chest 69: 43-47 (1976)
63. Rebar A.H., De Nicola D.B., Muggenburg B.A.:
Bronchopulmonary lavage cytology in the dog:
normal findings
Vet Pathol 17: 294-304 (1980)

64. Reynolds H.Y., Fulmer J.D., Kazmierowski J.A., Roberts W.C., Frank M.M., Crystal R.G.:
Analysis of cellular and protein content of bronchoalveolar lavage fluid from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and chronic hypersensitivity pneumonitis
J Clin Invest 59: 165-175 (1977)
65. Rubin R., Müller-Quernheim J.:
Studien zur Funktion von Makrophagen bei Sarkoidose II. Klinische Aktivitätsparameter der Erkrankung in Korrelation zur Zytologie der BAL
Prax Klin Pneumol 38: 425-455 (1984)
66. Rudd R.M., Haslam P.L., Turner-Warwick M.:
Cryptogenic fibrosing alveolitis
Am Rev Respir Dis 124: 1-8 (1981)
67. Saltini C., Hance A.J., Ferrans V.J., Basset F., Bittermann P.B., Crystal R.G.:
Accurate quantification of cells recovered by bronchoalveolar lavage
Am Rev Respir Dis 130: 650-658 (1984)
68. Sausville E.A., Peisach J., Horwitz S.B.:
Effect of chelating agents and metal ions on the degradation of DNA by bleomycin
Biochemistry 17: 2740-2746 (1978)
69. Semenzato G., Chilosi M., Ossi E., Trentin L., Pizzollo G., Cipriani A., Agostini C., Zambello R., Marcer G., Gasparotto G.:
Bronchoalveolar lavage and lung histology
Am Rev Respir Dis 132: 400-404 (1985)
70. Smith L.J.:
Bronchoalveolar lavage today
Chest 80: 251-252 (1981)
71. Snider G.L., Celli B.R., Goldstein R.H., O'Brien J.J., Lucey E.C.:
Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced in hamsters by endotracheal bleomycin
Am Rev Respir Dis 117: 289-297 (1978)

72. Spatafora M., Mirabella A., Rossi G.A., Bonanno A., Riccobono L., Carini C, Sacco O., Ravazzoni C.:
Lung inflammation in sarcoidosis: analysis of immunoglobulin levels in bronchoalveolar lavage fluid in active and inactive disease
Respiration 48: 127-135 (1985)
73. Schmucker P., Brendel C., König G.:
Die anästhesiologische Vorbereitung des Patienten mit Asthma bronchiale
14. Bielefelder anästhesiologisches Colloquium,
Zuckschwert-Verlag (1984)
74. Schneeberger E.E.:
Ultrastructure of intercellular junctions in the freeze fractured alveolar-capillary membrane of mouse lung
Chest 71: 299-300 (1977)
75. Thrall R.S., Barton R.W., D'Amato D.A., Sulavik S.B.:
Differential cellular analysis of bronchoalveolar lavage fluid obtained at various stages during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat
Am Rev Respir Dis 126: 488-492 (1982)
76. Weinberger S.E., Kelman J.A., Elson N.A., Young R.C., Reynolds H.Y., Fulmer J.D., Crystal R.G.:
Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease
Ann Int Med 89: 459-466 (1978)
77. White D.A., Gellene R.A., Gupta S., Cunningham-Rundles C., Stover D.E.:
Pulmonary cell populations in the immunosuppressed patient
Chest 88: 352-358 (1985)
78. Wulff J.C., Springmeyer S.C., Deeg H.J., Storb R.:
Canine bronchoalveolar cells: antigen-presenting macrophages are Ia-positive, lymphocytes are of non B-lineage
Blut 47: 263-270 (1983)
79. Zöllner F.:
Gustav Killian: father of bronchoscopy
Arch Otolaryng 82: 656-659 (1965)

Dankesworte

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die bei den experimentellen Arbeiten assistierten und die zur Fertigstellung dieses Manuskriptes beitrugen.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Professor Dr.med.Dr.h.c. Walter Brendel für die herzliche Aufnahme am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Besonderer Dank gebührt Herrn Professor Dr.med.Dr.med.vet. C. Hammer für die Überlassung des Themas und die exakte Korrektur der Arbeit.

Mein Dank gebührt vor allem auch Herrn Privatdozent Dr.med. G. König, Pneumologische Abteilung, Medizinische Klinik I des Klinikums Großhadern, der bereit war, die Arbeitsbetreuung zu übernehmen und als Korrektor tätig zu sein.

An Herrn Privatdozent, Dr.med. E. Patschke, Chirurgische Klinik des Klinikums Großhadern, ergeht mein herzlicher Dank für die Durchführung der Thorakotomien.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr.med. B.C. Adelman-Grill, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München für die schnelle Bestimmung der Enzymaktivitäten und die Anregungen zur Vertiefung der Thematik.

Herrn Professor Dr.med. K. Remberger, Pathologisches Institut des Klinikums Großhadern, danke ich für die Auswertung der histologischen Befunde.

Gedankt sei außerdem allen Kollegen und Mitarbeitern des Instituts für ihre verständnisvolle Unterstützung, im besonderen Frau E. Simon und Frau S. Münzing.

Lebenslauf

Name: Charlotte Ruth Schorer
geb.: 21.01.59
in: München/Bayern
Eltern: Walter Schorer, Versicherungsjurist
Edith Schorer, geb. Schartner

Schulausbildung in München

1965 - 1969 Grundschule am Bayernplatz
1969 - 1978 Sophie-Scholl-Gymnasium
1978 Abitur

Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilian-Universität München

1978 - 1980 Vorklinik
August 1980 Physikum
1980 - 1985 Klinik
August 1981 1. Staatsexamen
August 1983 2. Staatsexamen
Nov. 1985 3. Staatsexamen

Doktorarbeit

1983 - 1985 am Institut für Chirurgische Forschung,
Klinikum Großhadern
(Leitung: Professor Dr.Dr.h.c.W.Brendel)

Berufstätigkeit

vom 15.1.1986 Anästhesistin an der Klinik und Poliklinik
für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der
Universität Regensburg
(Leitung: Prof.Dr.H.Niederdelmann)

ab 1.5.1987 Anästhesistin am Institut für Anästhesiologie
am Klinikum Großhadern der Universität
München
(Leitung: Prof.Dr.K.Peter)

